

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie

Studijní obor: Farmacie



Průnik nanočástic sublingvální membránou 2

**Permeation of nanoparticles across sublingual
membrane 2**

Diplomová práce

Pavlína Dvořáková

Vedoucí práce: Mgr. Pavel Berka

Hradec Králové, 2012

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.

Pavλίna Dvořáková

Touto cestou bych ráda poděkovala všem, kteří mi pomáhali při realizaci této práce. Především vedoucímu diplomové práce Mgr. Pavlovi Berkovi za odborné vedení, zájem a čas, který věnoval mé práci. Dále katedře farmaceutické technologie za poskytnuté zázemí. Mé poděkování také patří kamarádce a kolegyni Martině Spurné, která se mnou spolupracovala.

ABSTRAKT

V teoretické části byla zpracována témata týkající se anatomie a fyziologie dutiny ústní, jazyka, sublingvální aplikace léčiv, nanočástic a byly popsány přístroje použité při měření.

V experimentální části diplomové práce byla sledována a popsána permeace nanočástic značených Chromeonem 470 přes prasečí sublingvální membránu s plochou 1 cm^2 nasycenou pufrům o pH 6,6 do pufru o pH 7,4 (akceptorová fáze) *in vitro*.

Při prvním prováděním permeačního pokusu byla použita dlouhodobě zmrazená sublingvální membrána (zmrazena 19. 1. 2011) a rozmrazena těsně před permeačním pokusem (7. 9. 2011). V druhém permeačním pokusu byly použity čerstvé sublingvální membrány naložené do fyziologického roztoku (14. 9. 2011).

U dlouhodobě zmrazených membrán byla zjištěna lepší permeace nanočástic, než přes čerstvě nařezané membrány a lépe pronikaly nanočástice z naředěné donorové fáze, než z neředěné.

Klíčová slova: Anatomie a fyziologie dutiny ústní, jazyka, nanočástice, Chromeon 470, sublingvální aplikace, sublingvální permeace.

ABSTRACT

In theoretical part of this work, the anatomy and physiology of oral cavity and tongue, sublingual application of active substances, nanoparticles are reviewed. Instruments used for measurements are also described.

In the following experimental part, the permeation of Chromeon 470 marked nanoparticles through porcine sublingual membrane into buffer pH 7,4 (acceptor phase) *in vitro* was evaluated. Sublingual membrane with surface 1 cm² was saturated by buffer pH 6,6.

During the first experiment, frozen sublingual membrane (19. 1. 2011) was used. It was thawed out just before the experiment (7. 9. 2011). In the case of the second experiment, fresh sublingual membrane, which was shortly immersed in the physiological solution, was used (14. 9. 2011).

Nanoparticles permeated better through a long-time frozen porcine membranes than through freshly cut up membranes. The nanoparticles permeated better from diluted samples than from non-diluted samples.

Keywords: Anatomy and physiology of oral cavity and tongue, nanoparticles, Chromeon 470, sublingual application, sublingual permeation.

Obsah

1 ÚVOD	9
2 ZADÁNÍ PRÁCE	11
3 TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1 Struktura, funkce dutiny ústní	12
3.2 Struktura, fyziologie lidského jazyka	14
3.3 Slinné žlázy, tvorba slin	17
3.4 Sublingvální přenos (podání léčiv do dutiny ústní a jejich absorpce)	18
3.4.1 Sublingvální transport - podmínky	18
3.4.2 Sublingvální podání léčiv	19
3.5 Nanočástice	20
3.5.1 Nanočástice, nanotechnologie – úvod	20
3.5.2 Nanočástice pro využití jako lékové formy	22
3.5.3 Příprava nanočástic	28
3.5.4 Výhody a využití nanočástic	32
3.5.5 Nevýhody a toxicita	33
3.5.6 Vlastnosti nanočástic značených fluorescenčním barvivem Chromeon	35
3.6 Použité metody měření	35
3.6.1 Spektrofluorimetr AMINCO BOWMAN Series 2	36
3.6.2 Fluorescenční mikroskop	37
3.6.3 DLS (Dynamic light scattering) - měření distribuce velikosti částic pomocí laserové difrakce	38
3.6.4 Mikroskop atomárních sil	40
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	41
4.1 Suroviny a materiál	41
4.2 Přístroje k permeačním pokusům	42
4.3 Biologický materiál	43
4.4 Složení a příprava pufrů, kalibrace pH – metru a stanovení hodnoty pH disperze nanočástic	44
4.4.1 Kalibrace pH – metru	44
4.4.2 Stanovení hodnoty pH disperze nanočástic	44
4.4.3 Složení fosfátového pufru dle Söerensena o pH 7,4.	44
4.4.4 Složení fosfátového pufru dle Söerensena o pH 6,6.	45
4.5 Příprava a složení vzorků pro DLS	46

4.6 Měření distribuce velikosti částic.....	47
4.7 Uspořádání permeačních pokusů	48
4.8 Centrifugace vybraných vzorků akceptorových fází pro DLS.....	50
4.9 Příprava kalibračních vzorků	50
4.10 Spektrofluorimetrické měření kalibračních vzorků a odebraných akceptorových fází z permeačních pokusů.....	51
4.11 Fluorescenční mikroskopie	52
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	54
6 ZÁVĚR	78
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	81
8 ZDROJE.....	82
9 PŘÍLOHA	86

1 ÚVOD

V posledních letech se velká pozornost obrací směrem k nanotechnologii, jež se uplatňuje v mnoha oborech lidské činnosti (medicína – léčba tumorů, strojírenství – katalyzátory, stavebnictví, textilní průmysl, elektronika – vysokokapacitní záznamová média, kosmický průmysl, atd.).¹

Nanotechnologie se mimo jiné, zabývá výzkumem nanočástic, které by mohly v budoucnosti znamenat velký mezník (roli, převrat) ve farmakoterapii (pomoc při diagnostice, bioimplantáty, ...), ale i v optických, elektronických oborech atd. V dnešní době jsou ve farmaceutické, lékařské praxi zatím více využívány mikročástice oproti nanočásticím, ale nanočástice jsou stále více zkoumány a v budoucnu budou snad také hojně využívány.^{1,3}

První zmínky o nanočásticích pocházejí již z 5. nebo 4. st. před n. l. z Egypta a Číny.²

Základní kameny nanotechnologie nastínil americký fyzik Richard Feynman na konci 50. let. Navrhl směr pro rychle se rozvíjející oblast nanotechnologie. Richard Feynman (11. května 1918 - 15. února 1988), nositel Nobelovy ceny, patřil k největším fyzikům 20. století. Základní myšlenky nanotechnologie zformuloval a představil ve své přednášce: „There is plenty of room at the bottom”, v překladu: „Tam dole je spousta místa“, v roce 1959 na výroční schůzi Americké společnosti fyziků na Caltechu.^{3,4} Fyzik Kim Eric Drexler, Timothy Leary se společně s Richardem Feynmanem podíleli na rozvoji nanotechnologie.^{1,3}

Koncem 20. století už uměli vědci manipulovat s atomy, molekulami a klastry na površích. A tak vědci následující Feynmanovu vizi použili atomy a molekuly jako stavební jednotky pro kompletaci struktur v řádech nanometrů zdola nahoru. Unikátní elektrické vlastnosti těchto nanočástic, stejně jako jejich optické a fotofyzikální vlastnosti, jako je velikostí kontrolovaná plasmonová absorbance a fluorescence, umožňují částicím předávat elektronické a fotonové signály.²

Na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové na katedře farmaceutické technologie se začal rozvíjet výzkum vlastností a chování nanočástic v posledních letech.

V předkládané diplomové práci je pozornost směřována k nanočásticím značeným fluorescenčním barvivem Chromeonem 470 a jejich schopnosti proniknout přes prasečí sublingvální membránu. Při prováděných permeačních pokusech byly použity dlouhodobě zmrazené prasečí sublingvální membrány a čerstvé prasečí sublingvální membrány. Fyziologické prostředí dutiny ústní a systémového oběhu lidského těla bylo napodobeno pomocí pufrů o pH 7,4 a pH 6,6 dle Sørensenova.

2 ZADÁNÍ PRÁCE

V zadání této diplomové práce bylo zjistit, zda jsou nanočástice značené fluorescenčním barvivem Chromeon 470 schopny proniknout při *in vitro* permeačních pokusech přes prasečí sublingvální membránu.

Pro *in vitro* permeační pokusy byly použity komerčně dostupné nanočástice značené Chromeonem 470, čerstvě vypreparované prasečí sublingvální membrány a dlouhodobě zmrazené prasečí sublingvální membrány.

Náplň jednotlivých úkolů:

1. Změření velikosti přítomných nanočástic v disperzi pomocí DLS.
2. Stanovení pH disperze nanočástic.
3. Charakterizace sublingválních membrán měřením transmembránového elektrického odporu.
4. Kvantitativní vyhodnocení průniku nanočástic při permeačních pokusech spektrofotometricky.
5. Porovnání svých výsledků s výsledky, které získala a vypracovala ve své paralelně prováděné diplomové práci Martina Spurná, která se také zabývala průchodem nanočástic značených Chromeonem 470 přes prasečí sublingvální membránu.

3 TEORETICKÁ ČÁST

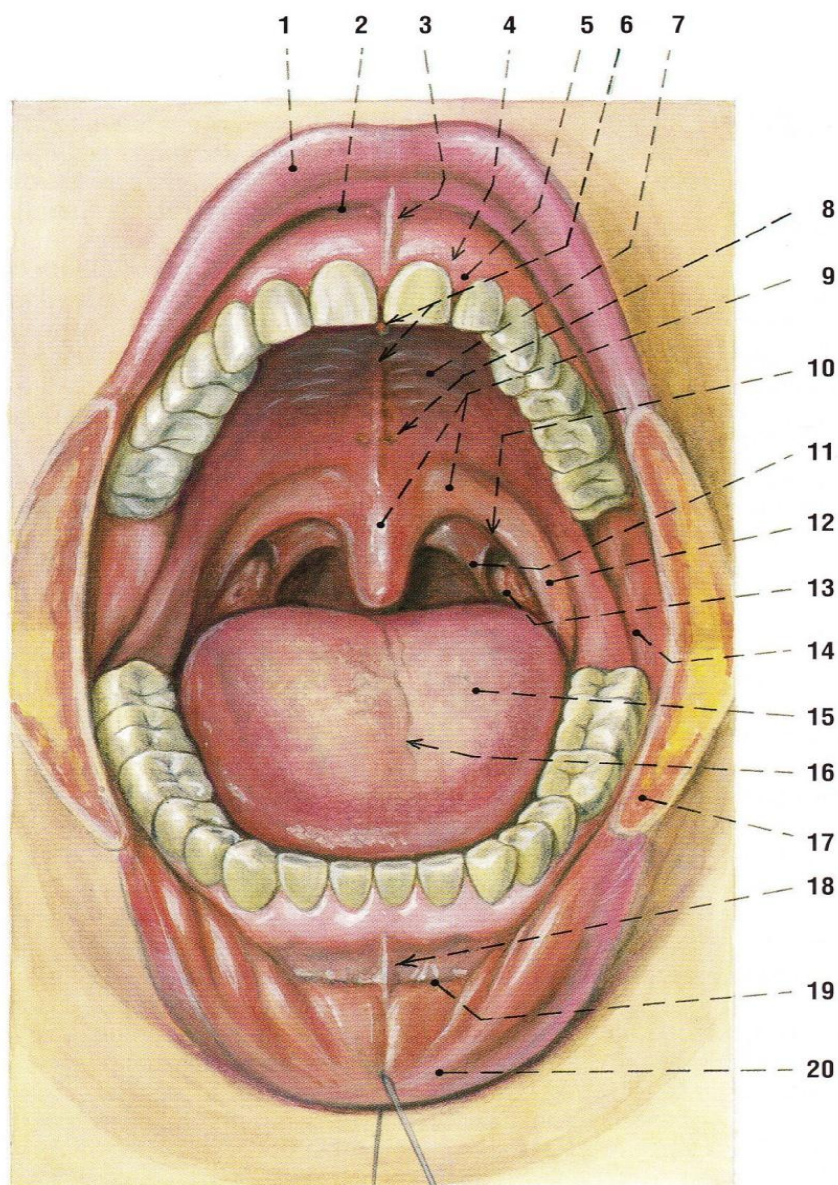
3.1 Struktura, funkce dutiny ústní

Dutina ústní (*cavitas oris*) je počáteční částí trávicího ústrojí člověka. Začíná ústní štěrbinou a pokračuje předsíní dutiny ústní přes vlastní dutinu s jazykem a zuby až k vchodu do hltanu. Ten přechází na úrovni obratle C6 v jícen, kterým se potrava dostává do žaludku k dalšímu zpracování.⁵

Dutina ústní je dále vymezena shora tvrdým (*palatum durum*) a měkkým patrem (*palatum molle*), zespoda hyoidním svalem (*musculus hyoideus*) a bříškem digastrického svalu (*musculus digastricus*). Tvrdé patro (*palatum durum*) je tvořeno kostí čelistní a kostmi patrovými. Na něj navazuje vzadu patro měkké (*palatum molle*). Jeho podkladem je vazivová aponeuróza a svaly měkkého patra a svaly hltanové úžiny. Uprostřed zadního okraje měkkého patra vyčnívá patrový čípek (*uvula palatina*). Zevně ústní dutinu lemují tváře a její svaly (žvýkačí a mimické) spolu s tukovým tělesem. V rámci dutiny ústní se také vymezuje výše uvedený termín předsíní dutiny ústní (*vestibulum oris*). Jde o tu část dutiny ústní, která se nachází mezi rty a zubními oblouky. Do ní ústí vývody slinné příušní žlázy (*glandula parotis*) uložené oboustranně před uchem. Za horním a dolním zubním obloukem, tvořeným 32 stálými zuby, najdeme vlastní dutinu ústní (*cavitas oris propria*), která přechází úžinou v hltan. V úžině leží mandle patrová (*tonsilla palatina*). Jde o lymfatickou tkáň oválného tvaru. Je součástí imunitního systému.⁵

Dutina ústní je důležitou součástí trávicího traktu člověka, neboť je zapotřebí k příjmu a prvotnímu zpracování potravy. Zuby napomáhají mechanickému rozmělnění potravy, stejně tak jazyk, který je připojen sublingvální membránou ke spodině dutiny ústní. Jazyk také plní funkci fonetickou. Je zapotřebí k tvorbě hlasu. Tváře a patro jsou zase potřebná pro rezonanci a zabarvení hlasu. Svaly měkkého patra se podílejí na polykacím aktu.⁵

Přes sliznici dutiny ústní se mohou vstřebat do krve živiny a léky, čehož se v medicíně využívá. Některé léky lze proto podávat pod jazyk, odkud se přes sublingvální membránu vstřebají velmi rychle do krevního oběhu.^{5,6}



Obr. 1: Dutina ústní, cavitas oris.⁵

1 labium superius
 2 fornix vestibuli superior
 3 frenulum labii superioris
 4 margo gingivalis
 5 papilla gingivalis
 (interdentalis)
 6-8 palatum durum
 a útvary na něm
 6 raphe palati a papilla
 incisiva

7 plicae palatinae
 transversae
 (rugae palatinae)
 8 foveola palatina
 9 palatum molle a uvula
 palatina
 10 fossa tonsillaris
 11 arcus palatopharyngeus
 12 arcus palatoglossus
 13 tonsilla palatina

14 sliznice tváře
 15 dorsum linguae
 16 sulcus medianus
 linguae
 17 m. buccinator (řez)
 18 frenulum labii
 inferiorit
 19 fornix vestibuli inferior
 20 labium inferius

3.2 Struktura, fyziologie lidského jazyka

Jazyk (příčně pruhovaný sval – vůlí ovladatelný) pokrytý sliznicí se nachází na spodině dutiny ústní. Je tvořen svalovou hmotou, která mu umožňuje široký rozsah pohybu. Svaly jazyka se připojují ke dvěma vazivovým strukturám *aponeurosis linguae* (zpevněná spodina sliznice hřbetní plochy jazyka) a *septum linguae* (sagitální vazivová ploténka ve střední čáře jazyka).⁵

Svalstvo je uspořádáno ve třech na sebe kolmých rovinách a mezi svazky vláken se nacházejí četné tukové buňky. Slizniční vazivo jazyka je pevně spojeno s vazivem, které obaluje svazky svalových vláken příčně pruhovaného svalstva.^{5,7}

Svaly, jimiž je jazyk utvářen, je kořen jazyka fixován k jazylce. Kořen jazyka nemá na svém povrchu papily, ale soubor lymfatických folikulů (*tonsila lingualis* = nakupení lymfatické tkáně při kořeni jazyka v jeho hltanové oblasti), jež pod epitelem kořene jazyka vytvářejí soubor lymfatické tkáně. Hřbet se opírá o patro, hrot je volný a ke spodině dutiny ústní připojen uzdičkou.⁵

Vlastní svaly jazyka můžeme rozdělit na vnitřní (*intraglosální*) svaly a vnější svaly (*extraglosální*). Svaly jazyka vnitřní – *m. longitudinalis superior*, *m. longitudinalis inferior*, *m. transversus linguae*, *m. verticalis linguae* a vnější svaly jazyka – *m. genioglossus*, *m. hyoglossus*, *m. styloglossus*, *m. palatoglossus* – se podílejí na rozmělnění potravy, tvorbě soust, na posouvání potravy dále do gastrointestinálního traktu, polykání, artikulaci – tvorbě hlasu.⁵

Veškeré svaly nacházející se v dutině ústní jsou inervovány z *nervus hypoglossus* (XII. hlavový nerv), až na jednu výjimku - *musculus palatoglossus*, který je inervován z *n. glossopharyngeus* (IX. hlavový nerv).⁵

Sliznice jazyka je tvořená mnohvrstevným dlaždicovým epitelem vybíhajícím do papil (papily nitkovité, kuželovité, houbovité, listovité a hrazené). Papily obsahují chuťové pohárky a tuhé kolagenní vazivo, jež chrání tkáň uloženou pod ní před škodlivými vlivy vnějšího prostředí. Díky nim má také jazyk nerovný povrch. Nitkovité papily (*papillae filiformes*) jsou ze všech přítomných papil zastoupeny nejčetněji. Jsou štíhlé, na konci roztřepené, se zrohovatělým povrchem. Papily kuželovité (*papillae conicae*) jsou u člověka vzácně se vyskytující, silně zrohovatělé,

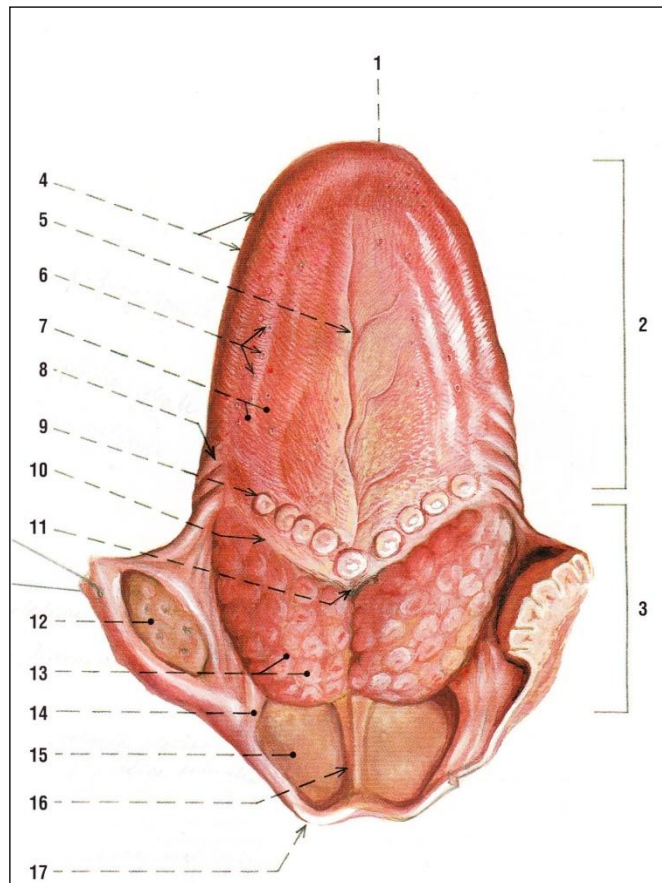
nacházející se především u kočkovitých šelem. Papily houbovité (*papillae fungiformes*) najdeme mezi nitkovitými papilami. Díky tenčímu epitelu jsou okem viditelné jako červené tečky. Papily listovité (*papillae foliatae*) vytvářejí vzadu na okraji jazyka (*margo linguae*) několik vertikálních, plochých, nízkých slizničních řas. V epitelu nalezneme chuťové pohárky. Papily hrozené (*papillae vallatae*) jsou největší a v počtu cca sedmi sestaveny do řady tvaru „V“. V jejich epitelu se nacházejí světlejší buňky, které vybíhají na povrchu v chuťové pohárky (*caliculi gustatorii*).^{5,8} Baze smyslových buněk pohárků jsou obklopeny zakončeními nervových vláken, která vedou chuťové vjemy (sladká, slaná, hořká, kyselá chuť).^{9,10}

Mapu jazyka - vnímání čtyř základních chutí (sladká chuť vnímána na špičce jazyka, hořká na kořeni a kyselá se slanou po stranách jazyka) publikoval v roce 1901 německý vědec D. P. Hanig na základě svého výzkumu.¹⁰

V současnosti se většinou uvádí, že existuje 5 chutí – sladká, slaná, hořká, kyselá a umami. Chuť umami (chuť glutamátu) identifikoval japonský vědec Kikunae Ikeda na počátku roku 1900. Spekuluje se také o existenci šesté chuti (přítomnosti receptorů pro tuk na jazyku).¹⁰

V roce 1974 došlo ke zpochybnění představy o mapování chutí do 4 oblastí na ploše jazyka americkou klinickou psycholožkou Virginií Collingsovou.¹¹ Po přezkoumání práce Haniga V. Collingsová zjistila, že celý jazyk může vnímat všechny tyto chutě více či méně stejně, navíc jsou chuťové receptory přítomny i kolem jazyka, na měkkém patře v zadní části úst a i na hrtanové příklopce (*epiglottis*).¹¹

Mapa jazyka v dnešní době představuje mýtus, který je v podstatě sto let starým nedorozuměním a představuje zjednodušené zobrazení vnímání chutí.¹⁰

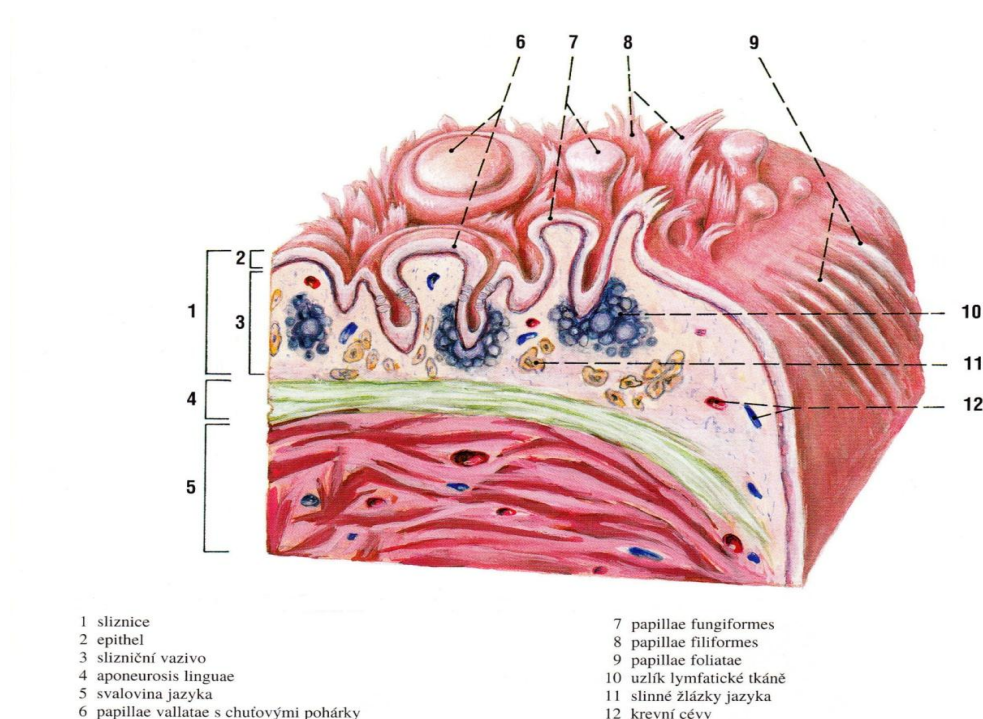


Obr. 2: Jazyk – pohled shora na vyjmutý preparát.⁵

1 apex linguae	10 sulcus terminalis	15 vallecula
2 corpus linguae	11 foramen caecum	epiglottis sinistra
3 radix linguae	linguae	16 plica
4 margo linguae	12 tonsilla palatina	glossoepiglottica
5 sulcus medianus linguae	13 tonsilla lingualis	mediana
6 papillae fungiformes	na radix linguae	17 okraj epiglottis
7 papillae filiformes	14 plica	
8 papillae foliatae	glossoepiglottica	
9 papillae vallatae	lateralis	

Epitel se skládá z několika vrstev epiteliálních živých buněk, které mají regenerační schopnost, jsou navzájem pevně spojeny, a proto nejsou mezibuněčné prostory velké. V bazální části se nacházejí cylindrické až kubické elementy a v apikální části najdeme ploché buňky. Funkce epitelu spočívá v mechanické ochraně a zabraňuje ztrátám vody. Epitel je vyživován pomocí difuze ze slizničního vaziva. Pod epitelem je vrstva tuhého kolagenního vaziva, v němž probíhají krevní cévy, proto má sliznice růžovou barvu.⁷

Obr. 3: Schematický zvětšený model stavby jazyka.⁵



3.3 Slinné žlázy, tvorba slin

Ve sliznici a podslizničním vazivu dutiny ústní jsou rozptýlené drobné slinné žlázy a tři objemné párové žlázy: příušní žláza (*glandula parotis*), podčelistní žláza (*glandula submandibularis*), podjazyková žláza (*glandula sublingualis*), jež ústí trubicovitými vývody na povrch sliznice. Žlázy jsou tvořeny aciny, které navazují na vsunuté vývody. Stěny acinů a vývodů jsou tvořeny jednovrstevným epitelem. V buňkách acinů se nacházejí sekreční váčky a do stromků žláz vstupují nervová zakončení sympatiku a parasympatiku. Tkáň má bohaté cévní zásobení.^{5,6}

Produktem slinných žláz jsou sliny, kterých za den vytvoří přibližně 1,5 – 2,0 litry. Sliny se skládají z vody (99,4 %), organických látek (bílkovina mucin, imunoglobulin A, enzym ptyalin = alfa-amyláza, lysozym) a anorganických látek (HCO_3^- , I^- , K^+ , Cl^- , Na^+ , Ca^{2+} , fosfáty, malá množství dalších látek). Jsou důležité pro správnou funkci dutiny ústní, jícnu a žaludku.⁶

Sliny se podílejí na štěpení cukrů (enzym amyláza), obalují a slepují rozmělněnou potravu a zvlhčují dutinu ústní, dále omývají zuby a mají antibakteriální účinky díky enzymům, které obsahují. Různé literární zdroje se neshodují na hodnotě pH dutiny ústní. Trojan et al. uvádí, že sliny zajišťují v dutině ústní hodnotu pH cca 6,4.⁶ Guyton tvrdí, že sliny zajišťují hodnotu pH v rozmezí 6,0 – 7,4¹² a Merglová uvádí hodnotu pH v rozmezí 6,4 – 7,0.¹³ Kittnar et al. uvádí hodnotu pH jako neutrální,¹⁴ Marsh uvádí pH v rozmezí 6,75 – 7,25.¹⁵

Sliny se tvoří neustále (bazální sekrece = cca 0,5 ml/min), jejich sekrece může být výrazně zvýšena drážděním chuťových a čichových čidel (látkový = humorální vliv) a reflexně na základě představ utvořených v mozkové kůře.⁶ Ovšem nárůst tvorby slin závisí na typu vyvolávajícího podnětu a úrovni hydratace organismu. Pokud není dostatek vody, tvorba slin klesá a ústa i hltan vysychají, což vede k pocitu žízně. Žízeň se stává důležitým faktorem pro udržení rovnovážné bilance tekutin v těle.⁶

Ovšem nárůst tvorby závisí na typu vyvolávajícího podnětu a úrovni hydratace organismu. Pokud není dostatek vody, tvorba slin klesá a ústa, hltan vysychají, což vede k pocitu žízně. Žízeň se stává důležitým faktorem pro udržení rovnovážné bilance tekutin v těle.⁶

3.4 Sublingvální přenos (podání léčiv do dutiny ústní a jejich absorpce)

V ústech významně neprobíhá trávení a ani vstřebávání i přesto že sliny obsahují enzymy a ústní sliznice má resorpční schopnosti, čehož se využívá při aplikaci některých léků. Léky uvolňující léčivo v ústní dutině můžeme rozdělit na léky orální, bukání a sublingvální.¹⁶

3.4.1 Sublingvální transport - podmínky

Přívod léčiv do organismu musíme podřídit farmakologickým, farmakokinetickým interakcím, spoluprací s daným pacientem a vlastnostem samotného léčiva (fyzikálně -

chemické vlastnosti léčiva). Léčiva můžeme aplikovat jak systémově (enterální a parenterální podání), tak i lokálně v závislosti na patofyziologii choroby daného pacienta a na terapeutických indikacích.^{17,21}

Sublingvální aplikace léčiv přináší mnoho výhod. Chrání dané léčivo před agresivním chemickým a enzymovým prostředím žaludku a před vlivem prvního průchodu játry (first - pass effect).^{16,18,19}

Pasivním transportem a filtrací procházejí účinné látky z velmi bohatě prokrvené (kapilární síť) sliznice dutiny ústní do horní duté žíly a následně do srdce, tím resorbované léčivo obchází játra, jelikož krev neteče přímo do portálního řečiště.¹⁷ Touto cestou je vhodné podat liposolubilní látky s malou molekulovou hmotností, které se přes tenkou membránu dutiny ústní dobře absorbují (např. nikotin, glyceroltrinitrát, propranolol) do systémového oběhu. Pro vstup a průnik léčiva sublingvální membránou jsou hlavní fyzikálně – chemické²¹ vlastnosti léčiva (lipo – hydrofilní vlastnosti léčiv, acidobazické vlastnosti, adsorpce na rozhraní fází, povrchové napětí, apod.), stavba a tloušťka membrány a její hydratace.^{17,18,19}

3.4.2 Sublingvální podání léčiv

Nejčastěji se tímto způsobem podává nitroglycerin (glyceroltrinitrát) při akutních srdečních obtížích jako vasodilatans, ale i jiná léčiva v malých tabletách (i jiných lékových formách – ve formě sprejů, lízátek, apod.), které se nechají volně rozpouštět pod jazykem.¹⁷ Dále mezi sublingválně podávaná léčiva můžeme zařadit léky s účinnými látkami nikotin, fentanyl citrát, buprenorphini hydrochloridum,¹⁷ i imunoterapii k léčbě alergie na pyl trav. Sublingvální tablety k léčbě ostatních alergií (na roztoče, pyl břízy atd.) jsou zatím ve vývoji.²²

Výhody sublingvální aplikace léčiv:

Tento způsob aplikace léčiv nám umožňuje přerušit, v případě potřeby, další vstřebávání léčiva odstraněním zbytku léčivého přípravku zpod jazyka (vyjmutí zbytku sublingvální tablety, výplach úst při podání léčiva ve formě spreje, ...), když se objeví vážnější nežádoucí účinek, či se nám podaří dosáhnout požadovaného účinku dříve, než

se celá tableta vstřebá.^{16,19,20} Léčivo je chráněno před agresivním chemickým, enzymovým prostředím žaludku a před vlivem prvního průchodu játry.^{16,18}

Absorpce u těchto léčiv z ústní dutiny bývá rychlejší než ze žaludku a vzdálenějších částí trávicího ústrojí. Účinek se většinou dostaví cca do dvou minut. Pro využití této cesty aplikace léčiva musí být splněny určité podmínky (dostatečná hydratace, spolupráce pacienta, nejíst v době absorpce léčiva podávaného sublingválně ...).¹⁷

Nevýhody sublingvální aplikace léčiv:

Po dobu, co je vloženo léčivo pod jazykem, se nesmí mluvit, kouřit a jíst. Sublingvální cesta podání léku se nehodí pro látky, které nepříjemně chutnají a dráždí.¹⁷ Touto cestou dochází ke ztrátám účinné látky polykáním slin, obsahujících rozpuštěné léčivo. K přerušení absorpce léčiva dochází při spolknutí tablety, či jejím vyjmutím z dutiny ústní.^{18,19,20}

Sublingvální lékové formy:

Sublingvální lékové formy mohou mít různé podoby: lízátka (např. fentanyl proti silným bolestem), porézní cukrové kostičky (např. parasymptomimetikum neostigmin, midazolam ze třídy benzodiazepinů pro léčbu křečí a pro vyvolání sedace a amnezie při lékařských zákrocích, analgetikum tramadol, anestetikum ketamin), spreje (glyceroltrinitrát) nebo lingvety (podjazykové tablety - př. nitroglycerin).^{17,18}

3.5 Nanočástice

3.5.1 Nanočástice, nanotechnologie – úvod

Nanotechnologie je velmi rychle se rozvíjející obor, který se zabývá výrobou a praktickým využitím takových částic a materiálů, které mají přesně definovanou strukturu na úrovni nanometrových rozměrů. V nanotechnologii jsou dvě výrobní metody „bottom-up” a „top-down”.²³ První metoda vytváří nanomateriály z atomů a molekul, zatímco druhá vytváří nanomateriály rozrušením makro-materiálů.²³ Do oblasti zájmu nanotechnologie tak spadají nejen nanočástice, ale i materiály

(nanomateriály) vzniklé sestavením základních struktur (částice o velikosti 1 – 100 nm) a objekty, které jedním či dvěma rozměry nanometrovou škálu převyšují (nanovlákná, nanofilmy). Zkoumáním jejich vlastností se pak zabývá nanověda.^{4,23}

Nanočástice tu jsou už od nepaměti, ale až v posledních desítkách let se dostávají do popředí zájmu vědců a výrobců celého světa. Mají totiž vlastnosti, které tytéž látky s částicemi v jiných rozměrech nemají. Je to dáno jednak jejich velikostí, jejich tvary a hlavně díky fyzikálně - chemickým a kvantovým jevům, ke kterým v nich dochází.^{2,24} Chemické složení je různorodé a do jisté míry určuje vlastnosti získaných nanočástic. Zajímavý je také obrovský nepoměr mezi velikostí povrchu nanočástic a objemem těchto částic.²⁶ Z nanočástic lze také udělat nanodrátky, uhlíkové nanotrubice, nanokompozity, keramické nanofilmy a vrstvy, nanokrystaly, nanopouzdra, nanovlákná.²³

Velikost nanočástic je v různých literárních zdrojích definována rozdílně. Albert Franks²³ uvedl (v roce 1987) definici velikosti nanočástic v rozmezí 1 až 100 nm (tzn. 10^{-9} m), která byla v roce 2005 pozměněna týmem Salamanca-Buentelli,²³ který publikoval, že nanočástice mohou být větší než 100 nm a Arshady²⁷ a další uvádějí, že to jsou všechny částice větší než 1 nm a menší než 1 000 nm (2007).

My se přikláníme k poslední uvedené definici velikosti nanočástic, jelikož pramení z novějších zdrojů.

Využití nanotechnologií a nanomateriálů je velmi rozsáhlé. Uplatňují se v mnoha oblastech lidského života: v elektronice (paměťová média), strojírenství (samočistící nepoškrabatelné laky, antikorozivní vlastnosti př. nanočástice oxidů železa – součást povrchových a základových barev, laků a nátěrů), chemickém (nanotrubice, nanokompozity, aerogely), elektrochemickém, optickém (optické filtry), automobilovém, kosmickém (katalyzátory) a vojenském průmyslu (nanosenzory), kosmetice, farmakologii i medicíně (cílená doprava léčiv).⁴

Vlastnosti a využití nanočástic:

- Nosiče jiných částic.^{16,30}
- Zajišťují ochranu před UV zářením (př. nanočástice oxidů železa se přidávají do opalovacích krémů) díky jejich schopnosti redukovat.²⁶

- Některé nanočástice (př. stříbrné) jsou součástí dezinfekcí, jelikož mají antibakteriální účinky.³²
- Stabilizátory sloučenin kovů.⁴
- Zabránění inkompatibilitám.¹⁶
- Stabilizace při skladování (kyslík, světlo, voda) a po aplikaci (pH, ochrana před degradací enzymy).¹⁶
- Maskování nepříjemných vůní a chutí léčiv (cystein, methionin).^{16,17}
- Snížení těkavosti léčiv (silice).¹⁶
- Jsou biodegradovatelné – rozklad v organismu probíhá cestou hydrolýzy či enzymaticky. Rychlost biodegradace a uvolňování léčiva lze ovlivnit změnami fyzikálně – chemických vlastností polymerů (krystalinitou, hydrofobními vlastnostmi, stereochemií monomeru, mírou kopolymerizace nebo molekulovou hmotností).³⁰
- Farmakoterapeutické hledisko
 - zmírnění vedlejších nežádoucích účinků (omezí se dráždění žaludeční sliznice léčivy, jako jsou kyselina acetylsalicylová, chlorid draselný, ...) nebo toxicity¹⁶
 - umožňují cílit účinek léčivých látek, kde jsou třeba (léčba rakoviny)³⁰
 - zvýšení účinnosti terapie³⁰
 - řízené uvolňování (př. iontů kovů – Ag, Cu,...), řízený transport cytostatik, specifické doručení antibiotik, antiparazitik³⁰
 - využití v perorálních lékových transportních systémech pro inzulin, proteiny, geny, pro vakcíny i při topické aplikaci³⁰

3.5.2 Nanočástice pro využití jako lékové formy

Nanočástice se podle stavby dělí na nanotobolky (nanočástice tvořené jádrem a obalem), nanosféry (matricová struktura s léčivem v ní dispergovaným nebo naadsorbovaným na povrch částice).¹⁶

Nanočástice jsou tuhé strukturované koloidní částicové systémy velikosti nanometrů (cca 1 – 1 000 nm).³¹ Kromě velikosti se nanočástice liší svou strukturou (morfologií). Tvar a povrch částic je obvykle sférický až nepravidelný. Představují nosiče léčiva

do orgánů či buněk pro parenterální, perorální i lokální aplikaci. Zmenšíme-li částice a zachováme jejich hmotnost, tak tím zvýšíme jejich počet a velikost povrchu.²⁶

Základní složky nanočástic používaných v lékových formách se dělí na nosič (carrier, vehikulum) a aktivní látku. Aktivní látkou se rozumí léčivá látka, antigen nebo diagnostická látka. Většina nanočástic je založena na organických polymerech či fosfolipidech. Nanočástice mohou být tedy tvořeny polymerovými micelami (10-100 nm), lipozomy (20-300 nm), dendrimerami (1,5-10 nm), chitosanem, fullereny, virovými vektory (nanočástice podobné virům),³⁰ polymery - polyestery, polyanhydridy, polystyren, polyetylen, proteiny, polysacharidy, plastifikovanými polymery (želatina + glycerol,...), gelem (alginát vápenatý,...), nízkomolekulárními látkami (lipidy, fosfolipidy, vosky, mastné kyseliny,...), kompozity (polyethylsiloxan + hydroxyapatit,...) či být ve formě multilamel, kompaktní bez pórů (5 nm-1 000 μm) nebo naopak s póry (5 nm až 1 000 μm).^{16,23,30}

Klasické nanočástice a v nich používané polymery:³⁰

- **Alifatické polyestery** – jsou vhodné pro parenterální podávání léčiv. V humánní a veterinární praxi jsou nosiči pro implantaci.
- **Poly-ε-kaprolakton** – je polymer s velmi pomalou degradací, která je výhodná pro lékové systémy s řízeným uvolňováním léčiv.
- **Polyalkylkyanoakryláty** – používány jako chirurgický šicí materiál v humánní medicíně díky jejich nízké toxicitě, dále z nich byly připraveny nanočástice s cytostatiky, antibiotiky a léčivy povahy peptidů a proteinů. Výhodou těchto nanočástic je možnost jejich endocytózy a transportu léčivé látky dovnitř buňky.
- **Přírodní polysacharidy (př. algináty)** – jsou používány v biomedicínských, farmaceutických, zemědělských a potravinářských produktech.

Léčivé látky, materiály, částice lze nejen umísťovat dovnitř nanočástic, ale také je upevňovat na jejich zevní povrch.³⁰

Velikost a tvar částic ovlivňuje nejen to, kde a jestli dojde k prostupu a vstřebání částic, ale též jak dlouho setrvají v organismu. Kulovité nanočástice pronikají hůře

než válcovité. Pružné částice zase cirkulují v těle zhruba čtyři dny, kdežto tuhé pouze hodiny.^{25,26}

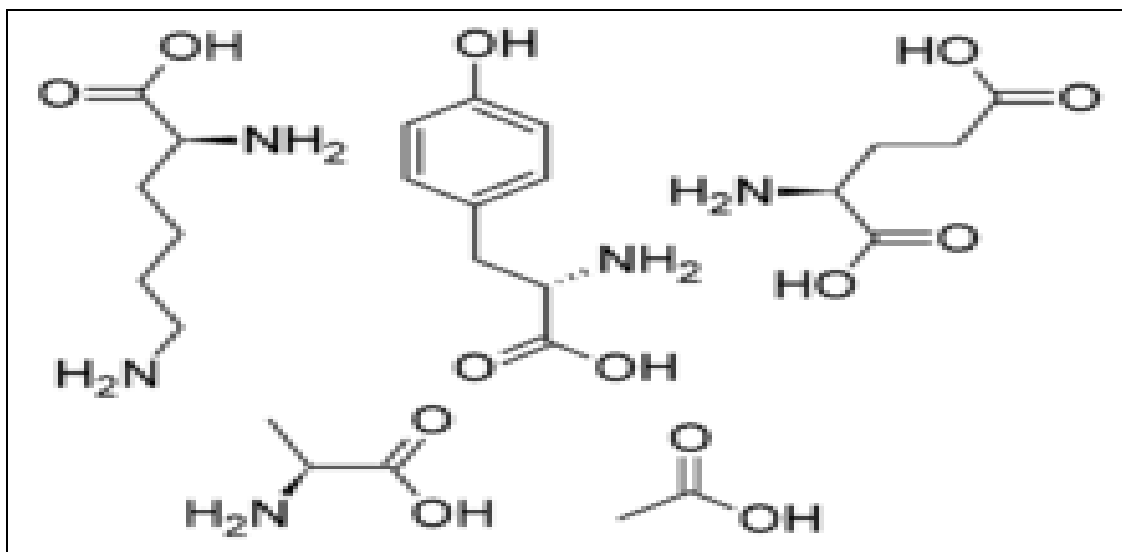
Dle velikosti použitých částic, jak již bylo uvedeno, určíme místo absorpce. Pro sublinguální přenos je vhodná velikost částic 1 až 1 000 nm, pro bukalní vstřebání 1 až 5 000 nm, pro subkutánní či intramuskulární podání zase 1 až 1 000 nm.^{24,25} Absorpce přes sublinguální membránu je možná pro hydrofobní částice (např. nitroglycerin).²⁶

Nanočástice také řeší problém s léčivý proteinové či peptidové povahy, které jsou převážně hydrofilní molekuly a špatně se vstřebávají pasivní difúzí. Ve střevě se lépe vstřebávají hydrofobní molekuly, díky tight – junction (těsné) spojení buněk. *Ileum* (kyčelník, třetí a poslední část tenkého střeva) je propustné pro velmi malé hydrofilní molekuly, nejspíše díky M - buňkám a Peyerovým plátům.^{25,26}

Léky mohou být k nanočásticím připojeny elektostatickými silami, kdy je nanočástice pozitivně či negativně nabitá a lék (peptid, glykoprotein atd.) s nábojem opačným (př. heparin - polysacharid s negativním nábojem).²⁶

V budoucnosti by se mohlo využít k navázání na nanočástice glatiramer acetátu, který je v současné době používán v praxi k léčbě roztroušené sklerózy. Dal by se tak přijímat per os a nemusel se aplikovat ve formě intramuskulární injekce jako nyní.²⁶

Obr 4.: strukturní vzorec glatiramer acetátu.³¹



Nanoemulze se využívají pro podání léčiv intravenózní cestou.²⁶

Nanosuspenze o velikosti částic pod 200 nm se dají použít k sublinguálnímu podání léku a o něco větší částice jsou vhodné pro vstřebání ve střevě M - buňkami a Peyerovými pláty po příjmu per os, což je pro pacienty příjemnější způsob podání léku, než injekční aplikace či zavádění čípků vaginálně nebo rektálně, zejména pokud jde o chronické užívání léku.^{25,26}

Nanočástice stříbra²⁶ vykazují antibakteriální aktivitu proti některým bakteriím (př. E. coli, Staphylococcus aureus).^{32,33} Antimikrobiální efekt je pravděpodobně způsoben ireverzibilní vazbou iontů stříbra na membrány, enzymy a nukleové kyseliny.^{34,35,36,37} Nanočástice stříbra se přidávají do hmoty pro výrobu textilního vlákna, čímž takto vzniklá příze získává antibakteriální vlastnosti.²⁸

Z krunýře korýšů se podařilo získat biopolymer chitosan, u něhož byla zjištěna vysoká antimikrobiální aktivita. Chemickou syntézou byly získány **chitosan-stříbrné-nanočástice**, které vykazují výrazně vyšší antimikrobiální aktivitu (proti př. E. coli, S. saprophyticus) než samotné složky.^{26,38}

„Chytré” nanočástice a jejich potenciální použití^{23,30}

„Chytré” nanočástice jsou novou zajímavou oblastí s mnoha potenciálními aplikacemi v chemii, farmacii, medicíně a v řízeném uvolňování léčiv.

Pojem „chytré” nanočástice označuje částice, které jsou schopné odpovídat na specifické prostředí či stimul. Tyto spouštěcí mechanismy mohou mít různou povahu (př. fyzikální - teplota, tlak, světlo, magnetické pole, fyzikálně - chemickou - bobtnání/smršťování, solvatace/desolvatace, iontovou – elektrolyty, pH, chelatace, molekulovou – receptorovou, enzymatickou – hydrolýza, nebo kombinovanou). Citlivost částic na uvedené podněty je dána vlastní strukturou částic, či připojením funkčních skupin k vlastní částici.

„Chytré” částice - polymerové lipozomy můžeme využít jako lékové mininosiče, které mohou nést hydrofilní léčiva ve svém hydrofilním jádře nebo hydrofobní látky ve své lipofilní membráně. Jsou připravované z přírodních lipidů a jejich velikost lze řídit v rozmezí 25 – 1 000 nm výběrem vhodné metody přípravy. Požadované vlastnosti mohou lipozomům dodat přírodní či syntetické polymery, které je možné připojit

jak k vnějšímu, tak i k vnitřnímu povrchu lipozomové membrány. Například povrchová modifikace lipozomů makrogoly (polyethylenglykoly) zvýšila dobu jejich cirkulace v krvi díky vysoké hydrofilitě a vysoké flexibilitě makrogolových řetězců a umožnila jejich využití jako nosičů léčiv pro parenterální aplikaci. Polymery můžeme připojit buď jejich hlavní částí, nebo koncem postranních řetězců.

Lipozomy citlivé na změnu pH

Lipozomy citlivé na slabě kyselé pH, při kterém se mohou rozpadat a uvolňovat obsažené léčivo. Tohoto by šlo využít v léčbě rakoviny, jelikož intersticiální tekutina některých nádorů u člověka má pH znatelně nižší, než je pH normální tkáně. Také mohou být využity jako transportní systémy pro molekuly, které membránou neprostupují a zajistit jejich transport do cytoplazmy, což umožňují polykarboxylové kyseliny, poly-N-izopropylakrylamidy, sukcinylované polyglycidoly, jež tuto vlastnost udílejí lipozomům.

Lipozomy citlivé na změnu teploty

Termosenzitivní polymery (podléhající konformační změně v závislosti na teplotě) navázané na povrch lipozomů udílejí lipozomům citlivost na změnu teploty. Polymery navázané na povrch lipozomů konci bočních řetězců jsou vhodnější než polymery připojené hlavním řetězcem, protože polymery navázané bočními řetězci mají větší konformační svobodu a uvolňují obsah lipozomů rychleji.

Dendrimerové polymery (dendrimery)

Dendrimery s dobře definovanou trojrozměrnou strukturou a s patrným jádrem a stěnou, jednotnou molekulovou strukturou, kterou lze přesně řídit v rozmezí 5 až 20 nm. Dají se do nich uzavřít molekuly aktivních látek, které se k nim poutají nekovalentními vazbami (iontovými, hydrofobními, vodíkovými). Dendrimery představují flexibilní nosiče, které je možné speciálně upravit na míru molekuly navázané látky.

Experimentálně byly připraveny dendrimery citlivé na pH, na teplo, na chemické, enzymatické změny a na světlo (*o*-nitrobenzyletherové skupiny, azobenzen a další fotosenzitivní skupiny). pH senzitivní dendrimery mohou být užitečné při transportu nukleotidů a cytostatik při změně pH. Fotosenzitivní dendrimery se mohou uplatnit ve fotodynamické terapii. Ostatní dendrimery jsou ve fázi raného výzkumu.

Dendrimery reagují na chemické změny redukcí nitroskupiny a její přeměnou na aminoskupinu vedoucí ke spontánní samodestrukci dendrimeru a k uvolnění navázaného léčiva (paklitaxelu-chemoterapeutikum).

Dendrimery dokáží samovolně tvořit micely o velikosti 50 – 55 nm, které jsou stabilní při fyziologických podmínkách, disociují při pH 5, při podmínkách nacházejících se často v pevných nádorech.

Polyiontové komplexní micely

Polyiontové komplexní micely představují potenciál pro diagnostiku a terapeutické aplikace genů a léčiv.

Micely tvořené z některých polyelektrolýtů a opačně nabitých biologicky aktivních molekul (enzymů, oligonukleotidů) mají ve své struktuře rozlišené jádro a stěnu. Stěna tvořená polyethylenglykolem je hydrofilní, jádro je polyiontové a je vhodným rezervoárem pro umístění různých látek (léčiv). Velikost se pohybuje v rozmezí 20 - 50 nm, ale může být i větší.

Micely se formují nekovalentní vazbami (mezimolekulovými elektrostatickými interakcemi), jsou citlivé na změnu podmínek (mohou odpovídat na různé podněty).

Micely s inkorporovanými oligonukleotidy reagují na změnu koncentrace glutathionu. Pro zajištění lepší stability jsou micely reverzibilně zesíťované disulfidickými vazbami. Jejich funkce je založena na tom, že koncentrace glutathionu je vyšší v buňce než v krvi a disulfidové vazby jsou stabilnější v krvi a labilní v intracelulárním prostředí.

3.5.3 Příprava nanočástic

Nanočástice můžeme získat hned několika způsoby. Liší se délkou přípravy, náročností a vlastnostmi vzniklých částic a tím i možnostmi použití. Mezi tyto způsoby patří polymerizace, polykondenzace, síťování, extrakce a odpařování rozpouštědla, koacervace, extruze, rozprašování, mletí a mikronizace, molekulární inkluze.¹⁶

Většina nanosfér vzniká polymerizací a polykondenzací a většina nanotobolek fyzikálně-chemickými procesy z předem připravených polymerů. Vzniklé částice mívají omezenou stabilitu a musí se zesíťovat nebo jinak upravit pro další zacházení. Výběr metody přípravy závisí na aplikaci a na vlastnostech léčiva, které má být do nanočástic zpracováno. Rozhodujícími kritérii při výběru metody přípravy a vhodných pomocných látek jsou biokompatibilita, rozkladné produkty, profil požadovaného uvolňování léčiva a cesta podání léku. Pro přípravu musí být použity pomocné látky, které jsou netoxické, biodegradovatelné (alifatické polyestery - polyglykolová a jejich kopolymery, poly- ϵ -kaprolakton, kyselina polymléčná, polysacharidy, želatina, polyhydroxyalkanoáty, polyalkylkryanoakryláty).³⁰

Polymerizace (emulzní, suspenzní)¹⁶

- Polymerizace se děje v disperzní soustavě, kde je přítomna jak léčivá látka, tak monomery (léčivá látka se pak zabuduje do struktury).
- Monomer je emulgován ve vodné fázi s emulgátorem (iniciátor = katalyzátor je buď rozpustný ve vodě – emulzní, nebo v monomeru – suspenzní).

Polykondenzace (mezifázová)¹⁶

- Reakce mezi různými monomery v nemísitelných kapalných fázích, při které se vytvoří film, který obklopí dispergovanou fázi jádra.
- Směs tvoří obvykle dva vzájemně reagující monomery, jeden ve vodném roztoku (disperzní) materiálu, který se stane jádrem, druhý emulgovaný v kontinuální fázi materiálu pro stěnu.
- Polykondenzace probíhá podstatně pomaleji než polymerizace.

Sítování¹⁶

- Dochází ke spojování řetězců polymeru v roztoku nebo gelu.
- Připravíme disperzní soustavu, ve které jsou obsaženy polymery.
- Následně přidáme k disperzní soustavě látku, která kovalentními vazbami stabilizuje strukturu polymeru, který se tak stává nerozpustným ve vodě (př. alginát sodný běžně rozpustný ve vodě + chlorid vápenatý – vápenaté ionty spojí dvě karboxylové skupiny alginátu a tím vytváří síť, díky které se stává alginát ve vodě nerozpustný).

Extrakce a odpařování rozpouštědla¹⁶

- Léčivo se rozpustí nebo disperguje v roztoku polymeru (vnitřní fáze) v organickém rozpouštědle (směsi rozpouštědel) s nízkou teplotou varu. Tento roztok se emulguje do vodné fáze, tak aby se vytvořila stabilní emulze o/v. Rozpouštědlo (př. dichlormethan, ethylacetát) se omezeně mísí s vnější fází.
- Snížením tlaku nebo zahřátím se organické rozpouštědlo odpaří a zůstává pouze polymer, který obaluje léčivou látku.
- Na formování částic touto metodou je vhodný např. roztok ethylcelulozy (více substituovaná je nerozpustná ve vodě) v trichlormethanu a vodný roztok laurylsíranu sodného.
- Po fázi formování částic následuje stabilizace. Stabilizátory o/v – polyvinylalkohol, polyvinylpyrrolidon, methylceluloza, želatina, poloxamery, polysorbáty.

Koacervace (fázová separace)¹⁶

- Jsou dva typy koacervace – jednoduchá a komplexní.
- Při jednoduché fázové separaci se používá jeden koloid (př. želatina ve vodě), u komplexní jde o interakci dvou koloidů (př. želatina a arabská klovatina).
- Spočívá v tvorbě agregátů makromolekul a jejich fázové separaci (lze vyvolat změnou pH, teploty, zředěním, cizím rozpouštědlem, elektrolyty) desolvací.
- Jednoduchá koacervace:
 - Připravíme koloidní roztok želatiny ve vodě.

- Poté v tomto roztoku dispergujeme léčivou látku (krystalky LL) a dále přidáme roztok síranu sodného nebo ethanolu a mícháme, čímž vyvoláme koacervaci želatiny (=fázová separace roztoku želatiny na dvě fáze – koncentrovanější a méně koncentrovanou - emulze v/v)
- Vznikají kapky koacervátu, které nabývají mezi-povrchovou energii, které se snaží zbavit a dochází k depozici částic na mezifázi – kapičky koacervátu se navzájem spojují nebo se zachycují na částici LL. Pak se sníží teplota a tvoří se stěna ve formě želatinového gelu.
- Následně se odstraní látka vyvolávající koacervaci – promýváním vodou nebo filtrací. Stabilizace stěny se provede přidáním aldehydu k želatině.
- Komplexní koacervace:
 - Připraví se olejová fáze (budoucí jádro) a vodná fáze (roztok želatiny)
 - Tato soustava se emulguje na emulzi o/v (želatina je zároveň emulgátor)
 - Pak se přidá vodný roztok arabské klovatiny stejné teploty.
 - pH se upraví na 4 – 4,5 použitím kyseliny – neutralizací náboje se tvoří koacervát, který se usazuje na kapkách oleje.
 - Přidá se vodný roztok methanolu / glutaraldehydu, pH se zvýší na 9 a směs se zahřeje na 50°C, aby se podpořilo zpevnění zesíťení želatiny.

Extruze¹⁶

- Je založena na vytlačování roztoku nebo taveniny do kapaliny.
- V přístroji na formování částic s kapalným jádrem, máme dvojitý zásobník (jeden je uvnitř druhého). Oba vyúsťují do trysek (dvojitá tryska). Konec této trysky je ponořen do kapaliny (např. chlazený tekutý parafin). Ve vnějším zásobníku je roztok materiálu, který vytvoří obal a ve vnitřním se nachází jádro.
- Při vytlačení obsahu vzniknou částice.

Mletí a mikronizace¹⁶

- Mikronizace je specifický postup patřící do operace mletí.
- Směs vosku se surfaktantem, která při teplotě nad 50 °C taje, se při pokojové teplotě zformuje mletím do nanočástic. Čím pomaleji se směs taví a rychleji mele, tím menší částice vznikají. Hydrofobní konec surfaktantu je v nanočástici a část s nábojem je na povrchu a interaguje s vodní fází.

Rozprašování¹⁶

- K výrobě částic lze využít i zařízení původně určená na sušení – rozprašovací sušárny.
- Dochází k sušení a krystalizaci.
- Jde o postup, při kterém se látka, která má vytvořit jádro, disperguje v „roztoku látky, která má tvořit stěnu.”
- Rozprašováním této disperze a odpařováním rozpouštědla se tvoří částice.
- Analogickým postupem je dispergace léčiva v tavenině (vosky, mastné kyseliny, mastné alkoholy) – rozprašování taveniny a její chlazení.

Emulgace¹⁶

- Míchání vysokou rychlostí nebo vmísení oleje do vodní fáze pod vysokým tlakem představuje další možnost přípravy emulze. Pevné částice rozpuštěné v kapkách oleje se shluknou v částice o určité velikosti a olej, který je zde jako solvent, odstraníme extrakcí do dalšího rozpouštědla, ve kterém je olejová fáze rozpustná.
- Nanočástice lze vytvořit také použitím vosku, který je tekutý při teplotě vyšší než pokojová a při pokojové teplotě je v podobě pevné. Léčivo rozpustíme v olejové fázi před emulzifikací při teplotě 40 – 60 °C. Po ochlazení na pokojovou teplotu získáme suspenzi, takže nemusíme odstraňovat rozpouštědlo. Takto vzniklé mikro- či nanočástice jsou nejvhodnější pro léčiva rozpustná v tuku a určená pro dlouhodobější postupné působení, tzv. **depotní léky**.²⁶

Dvojitá emulgace¹⁶

- U léčiv rozpustných ve vodní fázi jich nemůžeme tak velké množství inkorporovat dovnitř nosiče. Využije se proto metoda **dvojité emulze**. To znamená, že nejprve vytvoříme emulzi voda v oleji, pak emulzi olej ve vodě a na konec voda v oleji ve vodě.²⁶

Molekulární inkluze¹⁶

- K jejich výrobě se používají především β -cyklodextriny (7 glukosových jednotek spojených do kruhu).
- Do dutiny β -cyklodextrinu se zavede léčivá látka.
- β -cyklodextrin se rozpustí spolu s léčivou látkou v rozpouštědle (za tepla v lihu) a při změně podmínek (ochlazením soustavy) cyklodextrin krystalizuje a uzavírá léčivo ve vznikající „glukosové dutince.”
- Léčivá látka je pak tímto způsobem dobře chráněna v dutince (např. před oxidací).
- Př. u steroidních hormonů se takto zvyšuje rozpustnost a silice se zase tímto způsobem dobře uchovávají.

Pozitivně nabitě proteiny se mohou navázat na nepatrně nabitě nanočástice smícháním vodného roztoku peptidů se suspenzí nanočástic (glatiramer acetát, protamin sulfát, polylysin a ty, které mají nadbytek lysinových a argininových skupin vůči asparaginovým a glutamátovým skupinám). Místo peptidové molekuly mohou být použita aminoglykosidová antibiotika, jako jsou gentamycin, amikacin nebo tobramycin.^{25,26}

3.5.4 Výhody a využití nanočástic

Nanočástice jsou schopny vázat látky jak uvnitř sebe, tak na svou vnější strukturu a přitom nepřijít o výhodné vlastnosti. Mohou pronikat do tkání a materiálů, kam se částice jiných rozměrů nedostanou.^{23,25,30}

Nanočástice mohou sloužit jako nosiče pro transport některých obtížně vstřebatelných léčiv (perorálně podaný heparin, inzulin, hormony) do míst pro ně absorpčně přijatelnějších nebo mohou léčivou látku dopravit do cíle jejího terapeutického působení.^{23,30}

Od nanočásticových forem se očekává účinnější a bezpečnější farmakoterapie nádorových onemocnění (v onkologii), která spočívá v tom, že se léčivo dostane do postižené tkáně nebo orgánu a bude tam efektivněji působit na zhoubné buňky, čímž dojde ke snížení nežádoucích účinků na zdravou tkáň. Tohoto se dosahuje obalením cytotoxického léku do neškodného obalu nanočástic, který ochrání buňky těla a zvýší šanci dopravení léku k nádoru, a to ještě v účinné dávce (např. docetaxel). Do nosiče se také mohou navázat látky, které zajistí vazbu částice na specifickou strukturu, na nádor (např. přidání molekuly specificky se vážící na glykoprotein PSMA = prostate - specific membrane antigen, jenž je typický pro nádor prostaty). Také je možno vložit radionuklid, který ozáří postiženou tkáň.^{23,26,30}

Léky proteinového či peptidového charakteru, zabudované v nanočásticích, jsou chráněny před degradací enzymy a lépe procházejí přes membrány. Důležité je, že peptidy, polysacharidy a glykoproteiny jsou pomaleji degradovány, než když jsou volně v roztoku.^{25,26}

3.5.5 Nevýhody a toxicita

Problémy nanotechnologií souvisí s vlastnostmi použitých materiálů a dostupností technického zázemí potřebného pro jejich výrobu. Získat nanočástice potřebné velikosti a tvaru se daří díky náročným postupům a vysokému stupni technického pokroku. Problémem je velká finanční nákladnost a nejistota výsledků studií toxicity nanomateriálů a jejich interakcí s okolními tkáněmi a materiály.²³

Největším obecným problémem cíleného transportu částicových systémů krví je vlastní obranný systém organismu (filtrace částic plicemi a pohlcení částic makrofágy retikuloendotelového systému). Velmi náročné je při navrhování nanočásticových systémů zajistit dva protichůdné požadavky a to připojení léčivé látky k částici a její opětovné uvolnění v požadovaném místě (látko je nejprve neúčinná, účinnou

se stává až po odpojení z nosiče). Důležitá je taky rychlost uvolňování léčiva, která by měla zabezpečit jeho optimální účinek.³⁰

Termín „nanotoxikologie“ se poprvé objevil v roce 2004 a je definován jako věda zabývající se nanostrukturami a jejich efekty na žijící organismy.²³

Hlavní rizika vyplývají zejména z toxicity jednotlivých chemických komponent nanočástic. Nanočástice jsou tak malé, že se dostanou v organismu k jednotlivým buňkám, projdou stěnou střev, cév a i přes hematoencefalickou bariéru. Nanočástice snadno pronikají do lidského těla, jsou biologicky aktivnější než větší částice, mají větší měrný povrch a schopnost dlouhodobě přetrvávat v životním prostředí a hromadit se tam. Hlavní cestou pro vstup nanomateriálů ze znečištěného prostředí do lidského těla je respirační trakt, ale také gastrointestinální trakt a pokožka. Bylo zjištěno, že komerčně dostupný nanomateriál může proniknout skrz prasečí kůži. Nanomateriály mohou poškodit lidský organismus, ale přesné mechanismy toxicity nejsou známy a přesvědčivé důkazy musí být ještě stanoveny.^{23,30}

Nanočástice stříbra o průměru 30 nm a menší se ukládají v tkáních vyvíjejících se embryí ryb a mohou vyvolat závažné malformace včetně krevních výronů do hlavy a otoků, které vedou k úhynu rybích larev.^{28,29,39}

Studie o nanotoxicitě se většinou zaměřují na anorganické nanomateriály, které se skládají z těžkých kovů. Výzkum toxických efektů na žijící subjekty je požadován také u polymerních nanomateriálů.^{23,30}

Do organismu nesmí přijít materiály, které nejsou biokompatibilní. Velkým rizikem je předčasné rozrušení obalu matrix a tím uvolnění obsahu na nevhodném místě, kdy může dojít k poškození okolní tkáně. U makromolekulárních léčiv (oligonukleotidů, nukleových kyselin, protilátek) se požaduje transport dovnitř buňky či až do buněčného jádra. Pokud se léčivo uvolní jinde, pak nemá požadovaný účinek.^{23,26,30} Metalické stenty jsou názornými příklady s nízkou biokompatibilitou po implantaci, projevující se záněty, restenozami. Obalení stentů biokompatibilními polymery s navázaným léčivem významně zlepšilo jejich biokompatibilitu.²³ Výzkumníci sice stále vyvíjejí nové nanomateriály, které ale zatím nebyly užity v klinických aplikacích, zejména nedostatku patřičného testování na biokompatibilitu.³⁰

Je důležité si uvědomit, že částice stejného složení, ale jiné velikosti nemusí mít stejné vlastnosti, ať kladné, či negativní. A proto je třeba neopomíjet testy toxicity vedle rychlého a hojného vývoje nanočástic.^{25,26}

Nanočástice jsou dosti zkoumány a lze očekávat, že v budoucnosti najdou v terapii chorob nezastupitelné postavení. Předpokládejme, že přibude výčet jejich kladných vlastností a možností použití a naopak se odstraní či najdou řešení, jak snížit jejich nežádoucí účinky a limity dostupných technologií. Jsme uprostřed nanotechnologické revoluce, již jsme svědky nových technologií přenosu léčiv, které byly vyvinuty z nanotechnologií.²³

3.5.6 Vlastnosti nanočástic značených fluorescenčním barvivem Chromeon^{24,40}

Nanočástice z nového síťovaného polymeru (PD) značené fluorescenčním barvivem Chromeon se chovají podobně jako nanočástice z polystyrenu, ale mají nižší prostupnost pro kyslík a jsou fotostabilní. Uchovávají se v tmavém prostředí při 2 - 8°C, aby vlivem světla nedošlo k jejich znehodnocení. Jejich stabilita je garantována po dobu nejméně 6 měsíců.

Kromě toho se dají nanočástice z komplexu PD-Chromeon snadno odstředit při pH 5 a resuspendovat při pH 7, čehož lze využít např. při značení biologických molekul, jako jsou protilátky.

3.6 Použité metody měření

Luminiscence představuje emisi světla z nějaké látky a nastává při excitaci elektronů. Dělíme ji na fluorescenci, fosforescenci a zpožděnou fluorescenci. Fluorescenci pozorujeme během buzení (excitaci), nebo-li při dodávání energie. Po ukončení excitace fluorescence téměř ihned mizí (doba dohasínání se pohybuje řádově kolem 10^{-8} sekund).⁴¹

Látka, jež je schopná fluoreskovat, se nazývá fluorochrom.⁴² Fyzikální podstata fluorescence závisí na vlastnostech elektronového obalu atomu v molekulách

fluorochromu. Elektrony daných látek jsou schopny absorbovat foton excitačního světla a tím se zvýší jejich energie. Následně je část nově nabitě energie elektronem vyzářena jako foton s nižší energií a delší vlnovou délkou. Jelikož došlo ke ztrátě energie, je vlnová délka emisního světla vždy delší než vlnová délka excitačního světla. Protože vlnová délka určuje barvu světla, sledujeme u emitovaného světla posun k červené části spektra.⁴²

3.6.1 Spektrofluorimetr AMINCO BOWMAN Series 2

Spektrofluorimetr AMINCO BOWMAN lze využít ke stanovení nízkých koncentrací anorganických a organických sloučenin, umožňuje kvantitativní stanovení zkoumaného barevného vzorku. Vzorky jsou proměřovány v kyvetě. Přístroj umožňuje 3 D zobrazení, synchronní scan, atd. Spektrofluorimetry disponují zdrojem budícího záření v ultrafialové a viditelné oblasti spektra. Spektrofluorimetr AMINCO BOWMAN je citlivý, přesný a univerzální přístroj pro malé i velké vzorky. Pro měření je zapotřebí malé množství vzorku - cca 500 μl .⁴³



*Obr. 5: Spektorfluorimetr Aminco Bowman*⁴³

Fluorimetrie je metoda, která se využívá k měření intenzity fluorescenčního záření standardu. Měření intenzity emitovaného záření se provádí v úhlu 90° vzhledem k excitačnímu paprsku po průchodu filtrem, jež propouští především záření při vlnové délce fluorescence.⁴⁴

3.6.2 Fluorescenční mikroskop



Obr. 6: Fluorescenční mikroskop – OLYMPUS BX51⁴⁵

Fluorescenční mikroskopie slouží k vizualizaci objektů, které fluoreskují. Fluorescenční mikroskop umožňuje větší zvětšení a tím zviditelnění určitých látek a struktur v buňce, pozorování fluorescence dvoj- nebo trojrozměrných mikroskopických objektů, atd. Má dobrou rozlišovací schopnost, při zvětšení 1000x je nutné užití inverzního oleje.⁴⁶

Zdrojem světla u fluorescenčního mikroskopu je rtuťová výbojka.⁴²

Fluorescenční mikroskop, který je propojen s digitální kamerou (OLYMPUS DP 72) umožní vizualizaci nanočástic, jež fluoreskují.⁴²

3.6.3 DLS (Dynamic light scattering) - měření distribuce velikosti částic pomocí laserové difrakce

Metoda laserové difrakce umožňuje analýzu velikosti částic (dle objemu či intenzity rozptýlených paprsků), změření zeta-potenciálu a stanovení molekulové hmotnosti dispergovaných částic (př. emulze, nanočástice, micely, polymery, proteiny, koloidní disperze,...).^{47,48}

Pro měření touto metodou je zapotřebí pouze malé množství vzorku, který není třeba ani ředit nebo jen minimálně. Mohou se používat jednorázové kyvety, čímž se vyloučí riziko kontaminace z předchozího vzorku. Jednoduchá úprava vzorků se provádí filtrací, centrifugací (odstředěním) – odstředěním prachu a artefaktů.^{47,48,49}

Výhodou DLS je snadná manipulace. Umožňuje opakovatelné měření. Přístroj je spolehlivý, přesný, citlivý, s dobrým rozlišením.^{48,49}

Při průchodu laserového paprsku přes kyvetu, ve které je měřený vzorek rozptýlený ve vhodném médiu, nejčastěji vodě, dochází vlivem přítomných částic k ohybu (difrakci) laserového paprsku pod úhlem, jež je nepřímo úměrný jejich velikosti.⁵⁰

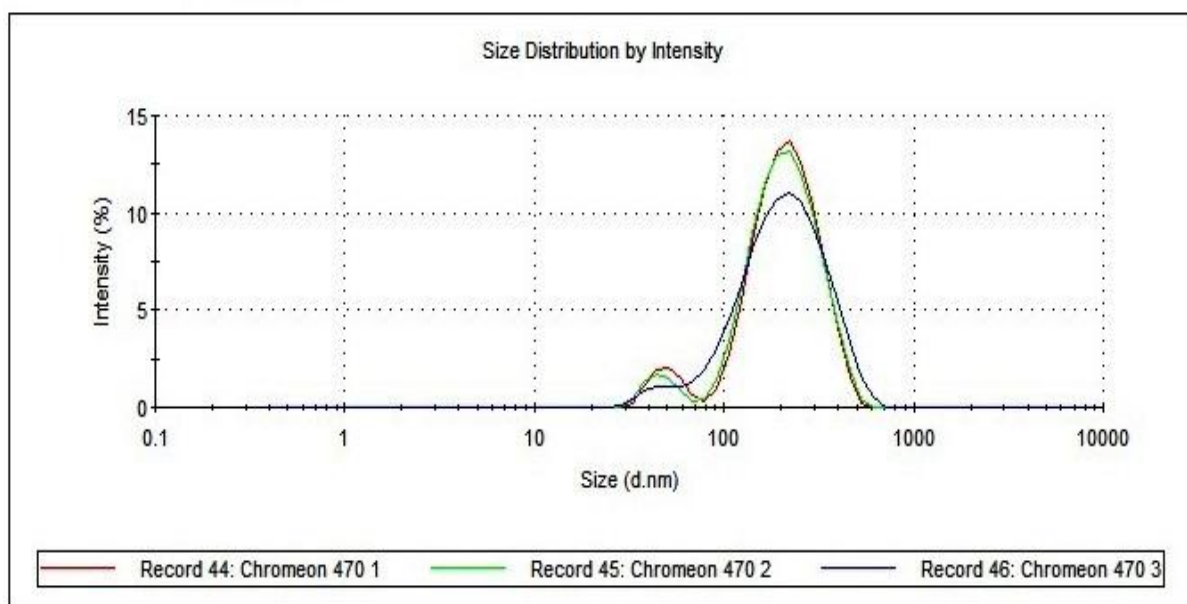


Obr. 7: Zetasizer Nano series ZS⁴⁸

Malé částice způsobují difrakci laserového paprsku pod velkým úhlem a paprsek dopadající na detektor má nízkou intenzitu, velké částice pak způsobují ohyb laserového paprsku pod malým úhlem a dopadající paprsek na detektor má velkou intenzitu.⁵⁰

Difrakční ohybový úhel vzrůstá logaritmicky s klesající velikostí částic, zatímco intenzita záření klesá v závislosti na objemu částic.⁵⁰

Na následujícím **obrázku 8** je zobrazen graf, který byl naměřen námi v průběhu prováděného experimentu - zastoupení velikosti nanočástic značených fluorescenčním barvivem Chromeonem 470 dle intenzity rozptýleného světla.



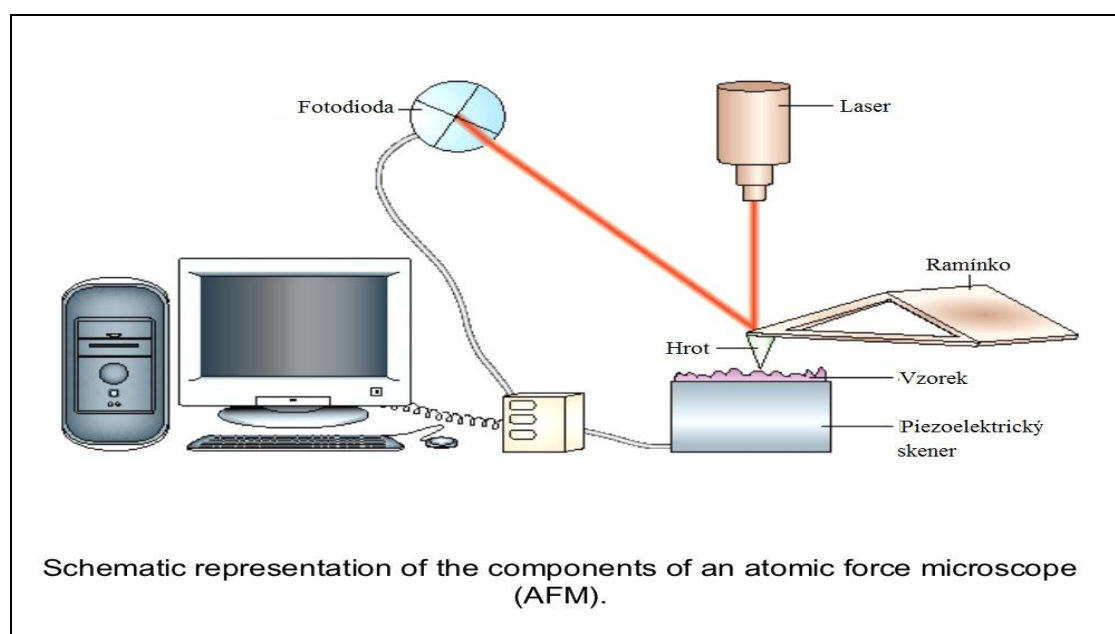
Obr. 8: Graf distribuce velikosti částic (nanočástice – Chromeon 470)

Před samotným měřením se vždy musí provést základní nastavení programu přístroje. Nastavuje se obvykle druh média, v kterém je rozptýlen měřený vzorek. Dále se vybere vhodný materiál nejbližší svými vlastnostmi zkoumanému vzorku (index lomu, absorpce záření). Po určitou dobu probíhá temperace vzorku, aby bylo dosaženo požadované konstantní teploty, za které bude probíhat samotné měření.^{48,50}

3.6.4 Mikroskop atomárních sil

Mikroskopie atomárních sil (AFM) patří mezi moderní mikroskopické metody a spadá do oblasti zájmu nanotechnologie, jelikož umožňuje nahlédnout do světa o nanometrových rozměrech. Prvně ji realizovali v roce 1986 Binning, Quate a Gerber.⁵¹

AFM se používá k trojrozměrnému zobrazování povrchů vzorků (př. nanočástic), kdy se obraz povrchu sestavuje postupně, bod po bodu. Výhodou této techniky je, že dosahuje velmi vysokého rozlišení, umožňuje zobrazovat, tvořit struktury či zpracovávat povrchy v nanometrové oblasti.⁵¹



Obr 9.: Schéma mikroskopu atomárních sil.⁵²

Detekuje se pohyb zkoumacího hrotu (nejčastěji pomocí laseru) při průchodu nad vzorkem. Umí zobrazovat i nevodivé vzorky. Během měření se hrot, upevněn na ohebném nosníku, pohybuje po povrchu vzorku v pravidelném rastru tak, že výška druhého konce nosníku je konstantní. Pokud je povrch vzorku nerovný, pak má nosník v různých místech vzorku různou velikost ohnutí a sledováním závislosti ohnutí na poloze na vzorku můžeme sestavit zvětšený obraz vzorku.⁵¹

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Suroviny a materiál

Název suroviny	Výrobce (resp. dodavatel)
Prasečí jazyk	Skaličan a. s., Česká Skalice, ČR
Aqua pro iniectione	Ardeapharma a. s., Ševětín, ČR
Aqua purificata	FaF UK, Hradec Králové, ČR
Dinatrii phosphas dodecahydricus	Dr. Kulich Pharma, s. r. o., Hradec Králové, ČR
Chlorid sodný	Penta. Ing. Petr Švec, Praha, ČR
Natrii dihydrogenophosphas dihydricus	RNDr. Jan Kulich, Hradec Králové/Říčany, ČR
Nano beads based on PD, Chromeon 470–marked (Lot no. BCBC1020V)	Sigma-Aldrich, Praha, ČR

Pozn.: uvedené komerčně dostupné látky podle platných norem výrobců a dodavatelů odpovídaly deklarované jakosti.

4.2 Přístroje k permeačním pokusům

Typ přístroje	Výrobce
Předvážky Kern 440-45N	Kern ande Sohn GmbH, Balingen, Německo
Digitální pH-metr GRYF 209L	Elektronické přístroje, Havlíčkův Brod, ČR
Magnetická míchačka, Fisher Scientific 408 N	Fisher Scientific, Pardubice, ČR
Zetasizer – Nano - ZS	Malvern instruments, Worcestershire, Velká Británie
Minitřepačka= Vortexová míchačka, MS 3 digital	IKA, Wilmington, USA, NC 28405
Fluorescenční mikroskop, OLYMPUS BX 51	Olympus, Tokyo, Japonsko
Lednička s mrazničkou	Liebherr, Ochsenhausen, Německo
Ohmmetr 41R	CHY, Taiwan
Termostatovaná vodní lázeň Grant JB 5 series	Grant, Anglie
Vícemístné ponorné míchadlo	Variomag Tele system, Německo
AMINCO BOWMAN Series 2, Luminiscence spectrometer	Thermo Spectronic, Madison, USA
Analytické váhy PIONEER TM, PA 430	Ohaus, Pine Brook, New Jersey, USA

Centrifuga EBA 20	Hettich zentrifugen, Tuttlingen, Německo
-------------------	---

Sestava pro fluorescenční mikroskop typ OLYMPUS BX 51 se skládá ze světelného zdroje OLYMPUS U - RFL - T, rtuťové lampy model U - LH 100 H GAPO, WIB filtru U - MWIB 3 a digitální kamery OLYMPUS DP 72. V tomto případě dochází k excitaci při vlnové délce 460 - 495 nm.

4.3 Biologický materiál

Pro permeační pokusy byly použity jako model sublingvální membrány z prasečích jazyků, jež jsou podobné sublingvální membráně lidského jazyka. Tento materiál byl získán z prasete domácího *Sus scrofa f. domestica*.

Z prasečího jazyka byla vypreparována sublingvální membrána. Potrhaná, proděravěná či jinak poškozená sublingvální membrána nebyla použita při prováděných permeačních pokusech. Zpracování prasečích jazyků bylo provedeno v několika krocích. Nejdříve byl oddělen celý jazyk od ostatních částí dutiny ústní. Následně se odstranila větší část svaloviny jazyka. Zůstala sublingvální membrána jazyka s menším množstvím svaloviny, která byla následně očištěna a zbavena posledních zbytků svaloviny pomocí skalpelu. Poté sublingvální membrána byla vložena do fyziologického roztoku a připravena k použití pro permeační pokusy.

Pro první permeační pokus byla použita sublingvální membrána z prasečího jazyka, která byla dlouhodobě zmrazena (19. 1. 2011) a uchovávána po celou dobu v mrazničce v polyethylenové folii. Dne 7. 9. 2011 byla tato membrána v dlaních rozmrazena a rozřezána cca na čtverce vhodné velikosti pár minut před sestavením permeačních cel.

Pro druhý permeační pokus, který byl uskutečněn 14. 9. 2011, byly použity čerstvě vypreparované membrány, které byly rozřezány na části vhodné velikosti, jako při prvním experimentu.

4.4 Složení a příprava pufrů, kalibrace pH – metru a stanovení hodnoty pH disperze nanočástic

4.4.1 Kalibrace pH – metru

Před přípravou fosfátových pufrů dle Söerensena o pH 7,4 a pH 6,6 byla provedena kalibrace pH – metru Gryf 209 L, vybaveného elektrodou THETA '90 (bev), typ HC 113.

Ke kalibraci byly použity dva pufrы a to jeden o pH 10,0 (Orion application Solution, Orion 910110), druhý o pH 7 (Orion application Solution, Orion 910107) od firmy Thermo Electron Corporation.

4.4.2 Stanovení hodnoty pH disperze nanočástic

Do celého vzorku disperze nanočástic PD-Chormeon 470 (Sigma Aldrich) byla ponořena měrná elektroda pH-metru pro stanovení příslušné hodnoty pH nanočástic. Před ponořením do disperze nanočástic byla měrná elektroda opláchnuta destilovanou vodou a osušena buničinou.

4.4.3 Složení fosfátového pufru dle Söerensena o pH 7,4.

(rozpis na 1000,0 ml):

Surovina	Množství (g)
Natrii dihydrogenphosphas dihydricus	2,1
Dinatrii phosphas dodecahydricus	19,1
Natrium chloratum	4,4
Aqua purificata	ad 1000,0 ml

Příprava fosfátového pufru dle Söerensena o pH 7,4:

1. V kádince s 500 ml vody se rozpustily daná množství dihydrogenfosforečnanu sodného a chloridu sodného za použití míchačky. Chlorid sodný byl přidán k dihydrogenfosforečnanu sodnému.
2. Hydrogenfosforečnan sodný se rozpustil v 400 ml vody.
3. Do roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného se postupně doléval roztok hydrogenfosforečnanu, dokud pomocí pH-metru nebylo dosaženo požadovaného pH.
4. Po dosažení dané hodnoty pH se vzniklý roztok doplnil vodou na 1 000 ml.
5. Pufr se převedl do odměrné baňky. Odměrná baňka s připraveným pufrům se uzavřela parafilmem, aby se předešlo vniknutí nečistot do pufru a uchovávala v ledničce při teplotě 2°C – 6°C bez přístupu světla.

4.4.4 Složení fosfátového pufru dle Söerensena o pH 6,6.

(rozpis na 1000,0 ml):

Suroviny	Množství (g)
Natrii dihydrogenphosphas dihydricus	6,2
Dinatrii phosphas dodecahydricus	9,5
Natrium chloratum	4,9
Aqua purificata	ad 1000,0 ml

Fosfátový pufr dle Söerensena o pH 6,6 byl připraven stejným způsobem jako fosfátový pufr dle Söerensena o pH 7,4 v **oddíle 4.5.2.**

4.5 Příprava a složení vzorků pro DLS

1. vzorek – disperze nanočástic (rozpis na 100,0 ml):

Surovina	Množství
Nanočástice PD-Chromeon 470	20 μ l
Aqua pro iniectiione	ad 100,0 ml

Postup přípravy 1. vzorku:

Do odměrné baňky o objemu 100,0 ml bylo nalito asi 60,0 ml Aqua pro iniectiione, do tohoto množství bylo přidáno 20 μ l disperze nanočástic PD-Chromeon 470. Veškerý obsah byl následně důkladně protřepán. Nakonec byla odměrná baňka doplněna na konečný objem 100,0 ml Aqua pro iniectiione a opět protřepána s příslušným obsahem.

2. vzorek

Surovina	Množství
Nanočástice PD-Chromeon 470	20 μ l
Fosfátový pufr dle Söerensena o pH 7,4	1 ml

Postup přípravy 2. vzorku:

Pro přípravu 2. vzorku byla použita injekční stříkačka o objemu 5 ml DIN GEPRÜFT od firmy CHIRANA PREMA, Stará Turá, Slovensko, jednorázový bakteriální filtr (s velikostí pórů 0,22 μ m) MILLEX GP, Carigt wohill, Co. cor, Irsko a jednorázové kyvety o rozměrech 12,5 x 12,5 x 45 mm, CERTIFIED, Německo/BRAND.

Nejdříve bylo odebráno do injekční stříkačky 5 ml pufru o pH 7,4, z toho bylo použito 2 ml na propláchnutí bakteriálního filtru, další 2 ml na propláchnutí kyvety a následně byl zbylý 1 ml pufru o pH 7,4 přefiltrován do jednorázové kyvety. K 1 ml pufru o pH 7,4 bylo přidáno pomocí mikropipety 20 μ l nanočástic, pak byla kyveta uzavřena pomocí parafilmu a obsah byl protřepán na vortexové míchačce. Tímto byl vzorek připraven k měření.

3. vzorek

Surovina	Množství
Nanočástice PD-Chromeon 470	20 μ l
Fosfátový pufr dle Söerensena o pH 6,6	1 ml

Postup přípravy 3. vzorku:

3. vzorek byl připraven úplně stejným způsobem jako 2. vzorek, jen byl pufr o pH 7,4 zaměněn za pufr o pH 6,6.

4.6 Měření distribuce velikosti částic

Z disperze (vzorek 1) připravené postupem popsaným v **oddíle 4.5** byl odebrán 1 ml množství vzorku do kyvety ke zjištění zastoupení velikosti přítomných zkoumaných nanočástic značených Chromeonem 470. Zastoupení velikosti nanočástic (dle objemu a intenzity) ve vzorku bylo změřeno laserovou difrakcí na přístroji Zetasizer Nano ZS. Vzorek byl před vložením do přístroje protřepán na vortexové míchačce IKA MS 3.

Vzorek byl v Zetasizeru před měřením temperován 2 minuty na teplotu 25°C. Jako disperzní prostředí byla v softwaru DTS nastavena voda (Water-Malvern) a jako materiál byl nastaven polystyrenový latex (Polystyrene Latex-Malvern, index lomu 1,590 a absorpce 0,01).

Vzorky 2 a 3 připravené postupy popsány v **oddíle 4.5** byly proměřeny přístrojem DLS k ověření, že nebudou nějakým způsobem ovlivňovat fosfátové pufr o pH 7,4 a pH 6,6 zkoumaný vzorek (nanočástice) a zkusit výsledky získané z provedených permeačních pokusů.

4.7 Uspořádání permeačních pokusů

V první fázi byly kompletně sestaveny cely a naplněny akceptorovou fází pomocí injekční stříkačky. Při vkládání sublingvální membrány mezi plexi – sklíčka při sestavování cel se muselo postupovat opatrně, aby se membrána neprotrhla a zůstala napnutá. Po kompletním sestavení bylo důležité, aby všechny cely měly stejnou stabilní teplotu 37°C. Toho se dosáhlo jejich umístěním do předem připravené vodní lázně vytemperované na požadovanou teplotu. Teplota trvala přibližně hodinu. Současně bylo akceptorové médium promícháváno magnetickým míchadlem. Při plnění cel akceptorovou fází se muselo dávat pozor, aby nedošlo k průniku vzduchu a nevytvořily se bublinky, které by ovlivnily negativně výsledky průniku nanočástic. Po vytemperování cel byla nahoru nanесena donorová fáze (pufr o pH 6,6 dle Söerensena), aby se sublingvální membrána nasýtila. Nanесením donorové fáze se rozumělo její umístění do přesně vymezeného prostoru o známé ploše sublingvální membrány. Tato plocha byla vymezena plexi - sklíčkem.

Postup byl následující:

1. Na plochu vymezenou plexi - sklíčkem bylo nanесeno 100 μ l donorové fáze (pufr o pH 6,6) a byl změřen elektrický odpor jednotlivých sublingválních membrán. Po změření odporu byla donorová fáze odsáta pipetou a dosušena rolovanou buničinou.
2. Po odsátí donorové fáze bylo nanесeno 100 μ l neředěného vzorku (disperze nanočástic) na 1. - 3. sestavenou celu a 100 μ l ředěného vzorku (1 : 4 pufr o pH 6,6) na 4. – 6. připravenou celu na vnější povrch sublingvální membrány pomocí pipety na plochu cca 1cm² při prvním permeačním pokusu.

3. Při druhém permeačním pokusu bylo naneseno 100 μ l neředěného vzorku na všech 6 sestavených cel. Exponovaná plocha membrány byla také cca 1 cm^2 .
4. Po nanesení disperze nanočástic byly cely opatrně zakryty krycím sklíčkem a kompletně sestaveny. Bylo nezbytné zkontrolovat, zda v akceptorových fázích nedošlo k průniku vzduchu a vzniku bublinek. Poté byly cely vráceny do vodní lázně.

Při prvním permeačním pokusu byly vzorky akceptorové fáze odebírány v množství 0,6 ml v předem stanovených časových intervalech, tedy po 1, 6, 21, 24 a 45 hodinách. Množství odebraného vzorku akceptorové fáze bylo doplněno stejným množstvím fosfátového pufru dle Söerensena o pH 7,4. Po uplynutí 24 hodin se už akceptorová fáze nedoplnila pufrem o pH 7,4 a permeační pokus byl ukončen. Po uplynutí 24 hodin se nechali cely sestavené a až po uplynutí 45 hodin (od zahájení pokusu) se cely rozebrali a přitom odebrali vzorky akceptorových fází a odebrali se také sublingvální membrány, které se poté sledovali ve fluorescenčním mikroskopu.

Při druhém permeačním pokusu byly provedeny odběry v časových intervalech po 1, 4, 7, 18, 24 hodinách v množství 0,7 ml. Množství odebraného vzorku akceptorové fáze bylo doplněno stejným množstvím fosfátového pufru dle Söerensena o pH 7,4.

Po uplynutí 24 a 45 hodin od začátku prováděných permeačních pokusů byly odebrány vzorky akceptorových fází k měření pomocí přístroje DLS za účelem zjištění, zda nějaké nanočástice pronikly přes sublingvální membrány a pokud ano, v jakém velikostním zastoupení (viz. **5 Výsledky a diskuze**).

Pod fluorescenčním mikroskopem byly pozorovány jak odebrané vzorky akceptorové fáze, tak sublingvální membrány (neomyté, omyté po provedených permeačních pokusech) použité během prováděných pokusů (viz. **5 Výsledky a diskuze**).

Ke stanovení koncentrace nanočástic v akceptorové fázi byla využita spektrofotometrie. Data získaná pomocí této metody byla následně zpracována (viz. **9 Příloha**).

4.8 Centrifugace vybraných vzorků akceptorových fází pro DLS

Kyvety s odebranými akceptorovými fázemi vybraných vzorků P1-1, P1-3 a P1-4 po 24 hodinách a po 45 hodinách byly umístěny do centrifugy pro odstředění větších částic přítomných ve vzorcích. Centrifuga byla zapnuta po dobu 15 minut, s 6 000 otáčkami/min. Po centrifugaci byly vybrané vzorky akceptorových fází opět změřeny pomocí DLS.

4.9 Příprava kalibračních vzorků

Zásobní disperze byla připravena smícháním 10 μ l disperze nanočástic PD-Chromeon 470 (Sigma Aldrich) s pufrům dle Söerensena o pH 7,4 do 100 ml odměrné baňky. Jeho následným ředěním pufrům dle Söerensena o pH 7,4, byly připraveny kalibrační roztoky o koncentracích:

standard (podíl zásobní disperze)	zásobní roztok (ml)	pufr o pH 7,4 (ml)	koncentrace (μ g/100 ml)
0	0	4,0	0
10	0,4	3,6	5
20	0,8	3,2	10
30	1,2	2,8	15
40	1,6	2,4	20
50	2,0	2,0	25
60	2,4	1,6	30
70	2,8	1,2	35
80	3,2	0,8	40
90	3,6	0,4	45
100	4,0	0	50

4.10 Spektrofluorimetrické měření kalibračních vzorků a odebraných akceptorových fází z permeačních pokusů

Stanovení koncentrace nanočástic v odebraných vzorcích bylo provedeno na spektrofluorimetru (AMINCO BOWMAN Series 2, Luminiscence Spectrometer, Thermo Spectronic). Koncentrace každého kalibračního roztoku byla stanovena minimálně ze tří provedených měření (řady připravených kalibračních vzorků) a získané hodnoty z jednotlivých měření byly následně zprůměrovány. Z takto získaných dat byla pomocí lineární regrese v Microsoft Excelu sestrojena kalibrační přímka, která je zobrazena v **oddíle 5**.

Každý odebraný vzorek (akceptorové fáze) z permeačních pokusů o objemu 400 μ l byl proměřen dvakrát a z těchto dvou měření byla vypočtena průměrná koncentrace nanočástic ve vzorku. Jako slepý (porovnávací) roztok byla použita voda.

Za jakých podmínek lze nejlépe stanovit množství nanočástic značených Chromeonem 470 v odebraných vzorcích, prozkoumal ve své diplomové práci Josef Janečka.⁵³ S jeho souhlasem byly převzaty parametry pro nastavení spektrofluorimetru.

Parametry nastavení spektrofluorimetru:⁵³

1. Excitační vlnová délka: 470 nm \pm 5 nm
2. Emisní vlnová délka: 600 nm
3. Počet cyklů: 25
4. Rychlost měření: 5 nm/s
5. Citlivost měření: 1275

Při měření byla použita semimikro-kyveta z křemenného skla. Kyveta byla před každým měřením zbavena nečistot. Před každou aplikací nového vzorku do kyvety byla křemenná kyveta vypláchnuta etanolem a destilovanou vodou. Detekce byla provedena spektrofluorimetricky při výše uvedených vlnových délkách.

4.11 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskop umožnil pozorovat zkoumané nanočástice značené fluorescenčním barvivem Chromeonem 470, které fluoreskovaly po excitaci zářením o vlnové délce 470 nm.

5. 9. 2011 byly připraveny preparáty ke sledování zkoumaných nanočástic značených Chromeonem 470 pomocí fluorescenční mikroskopie.

9. 9. 2011 (permeace P1) a 15. 9. 2011 (permeace P2) byla metoda fluorescenční mikroskopie využita k pozorování odebraných vzorků akceptorových fází z permeací P1 a P2 a ke sledování sublingválních prasečích membrán, na které byla aplikována disperze nanočástic při permeačních pokusech při permeaci P1.

- 1. Příprava vzorků** za použití bezbarvého laku na nehty – na podložním sklíčku byl za pomoci bezbarvého laku na nehty vymezen prostor pro nanesení vzorku (nanočástic PD-Chromeon 470 nebo odebrané akceptorové fáze jednotlivých vzorků z P1 a P2). Do takto vymezeného prostoru byla pomocí mikropipety aplikována kapka vzorku, která byla překryta krycím sklíčkem. Na krycí sklíčko byl vyvinut menší tlak, aby se nanesený vzorek rozprostřel. Na závěr bylo krycí sklíčko ohraničeno opět bezbarvým lakem na nehty.
- 2. Příprava vzorků** bez použití bezbarvého laku na nehty – mikropipetou byla nanесena kapka vzorku na podložní sklíčko. Kapka se překryla krycím sklíčkem. Krycí sklíčko bylo přimáčknuto a přebytečná tekutina byla odsáta buničinou.
- 3. Příprava vzorků** pro pozorování fluorescenční mikroskopií při zvětšení 1 000x – kapka vzorku byla nanесena mikropipetou na podložní sklíčko. Takto připravený vzorek byl přiklopen krycím sklíčkem kvůli pozorování při zvětšení 1 000x a při tomto zvětšení bylo nutné použít imerzní olej.
- 4. Příprava vzorků** pro pozorování prasečích sublingválních membrán dlouhodobě zmrazených (P1) – po rozebrání permeačních cel byly odebrány prasečí sublingvální membrány, rozprostřeny jednotlivě na podložní sklíčka a přiklopeny krycími sklíčky. Po zhlédnutí takto připravených preparátů

ve fluorescenčním mikroskopu byly tytéž membrány omyty destilovanou vodou a opět pozorovány.

Nastavení fluorescenčního mikroskopu:

WIB filtr: U-MWIB 3

Citlivost: ISO 200, 400, 800, 1600

Objektiv: 10x, 20x, 100x

Okulár: 10x

Expozice: 7 ms, 50 ms

Excitace: 460 – 495 nm

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Před zahájením samotných permeačních pokusů jsme se snažili získat, co nejvíce informací o zkoumaných nanočásticích (PD-Chromeon 470) a o vlivech použitých membrán a pufrů na disperzi nanočástic.

Instrumentální sestava použitá k permeačním pokusům pro fixaci sublingvální prasečí membrány byla ověřena používáním na katedře farmaceutické technologie.

Donorové médium (Söerensenův pufr o pH 6,6) zajistilo svým složením pH podobné prostředí dutiny ústní při *in vitro* permeačních pokusech. Touto donorovou fází byly nasyceny sublingvální membrány při permeačních pokusech P1 a P2 a naměřeny jejich transmembránové elektrické odpory. Následně byla na membrány aplikována disperze nanočástic.

Söerensenův pufr o pH 7,4 představoval akceptorovou fázi. Ta napodobovala prostředí systémového oběhu lidského těla *in vitro*.

U komerčně dodané disperze nanočástic (PD-Chromeon 470) bylo stanoveno pH nanočástic PD-Chormeon 470 a následně bylo zjištěno zastoupení velikosti přítomných nanočástic metodou dynamického rozptylu světla (DLS).

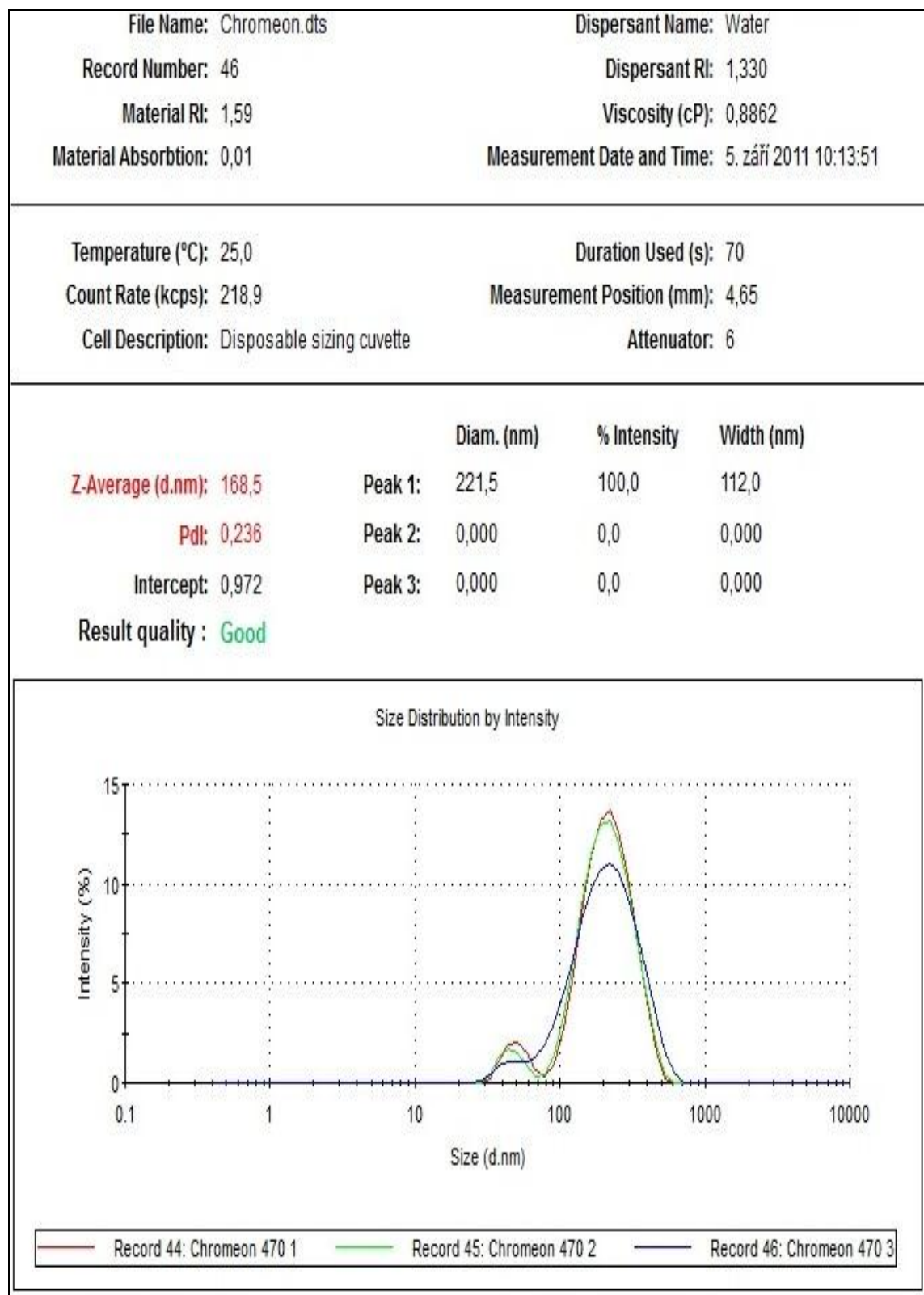
Naměřená hodnota pH disperze nanočástic PD-Chromeon 470 (Sigma Aldrich) byla naměřena postupem uvedeným v **oddíle 4.4.2**. Hodnota pH disperze nanočástic byla 6,65.

Zastoupení velikosti částic v disperzi nanočástic PD-Chromeon 470

Vzorky byly připraveny postupem uvedeným v **oddíle 4. 5** a změřeny pomocí DLS.

Graf 1 zobrazuje zastoupení velikosti částic ve vzorku disperze nanočástic ve vodě Chromeon 470 1 – 3 dle intenzity. Dále jsou v tabulkách shrnuty údaje získané z DLS disperze nanočástic (NČ) a pufrů o pH 7,4 a 6,6 dle Söerensena-bude uvedeno dále. **Graf 1** představuje typickou ukázkou výsledků získaných z DLS.

Graf 1: Zastoupení nanočástic ve vzorku disperze nanočástic ve vodě Chromeon 470 1 - 3 z hlediska intenzity.



Tabulka 1.: Výsledky z DLS pro disperzi nanočástic, pufrů o pH 7,4 a 6,6 dle Söerensena.

Chromeon 470	Měření	Z-Average d.nm	PdI	Pík 1 d.nm	Pík 2 d.nm	Pík 1 %	Pík 2 %
Aqua pro injectione	1	169,7	0,217	226,0	51,3	92,3	7,7
	2	169,8	0,217	223,8	47,0	93,9	6,1
	3	168,5	0,236	221,5	0	100,0	0
	Průměr SD	169,3 +0,7	0,223 0,011	223,8	32,8	95,4	4,6
pH 6.6	1	169,1	0,229	224,6	38,8	94,5	5,5
	2	166,4	0,213	217,4	42,0	94,7	5,3
	3	168,1	0,260	245,2	57,1	89,0	11,0
	Průměr SD	167,9 +1,4	0,234 0,024	229,1	46	92,7	7,3
pH 7.4	1	171,2	0,257	228,8	47,7	93,5	6,5
	2	168,4	0,233	228,6	49,1	93,6	6,4
	3	166,9	0,236	223,9	42,9	95,4	4,6
	4	170,5	0,237	232,4	49,4	92,9	7,1
	5	169,4	0,219	221,8	0	100,0	0
	6	171,8	0,230	229,9	43,6	93,9	6,1
	Průměr SD	169,7 +1,8	0,235 0,012	227,6	38,8	94,9	5,1

Výsledky měření z DLS uvedené v **tabulce 1** naznačují, že pufrů o pH 7,4 a pH 6,6 nemají vliv na zastoupení velikostí částic v disperzi nanočástic PD-Chromeon 470.

Transmembránové elektrické odpory sublingválních membrán

Pro charakterizaci sublingválních membrán byly změřeny jejich odpory (ze tří měření jednotlivých vzorků byl vyjádřen průměr). Byla formulována hypotéza: čím slabší sublingvální prasečí membrána, tím menší bude její odpor a lepší průnik nanočástic do akceptorové fáze. Na sílu membrány měly vliv následující faktory: kvalita očištění membrány (zbytky svaloviny), struktura, defekty.

Výsledky naměřených odporů a množství nanočástic prošlých do akceptorové fáze jsou uvedeny v **tabulkách 2 a 3** a znázorněny v **grafu 2**. Uvedené hodnoty naměřených odporů vyvracejí vytvořenou hypotézu a potvrzují lepší průnik nanočástic skrz

membrány s vyšším odporem. Proč tomu tak je, zůstává otázkou a navrhl bych, aby tato skutečnost byla hlouběji prozkoumána v budoucích pracích podobného charakteru.

Membrány, které byly dlouhodobě zmrazeny, mají několikrát nižší transmembránový elektrický odpor než membrány čerstvé (ve fyziologickém roztoku).

Tabulka 2.: Výsledky měření odporu membrán (dlouhodobě zmrazených) po sestavení cel - **Permeace P1** (7. 9. 2011) – závislost množství prošlých nanočástic po 24 hodinách skrz membránu o velikosti 1cm^2 na elektrickém odporu.

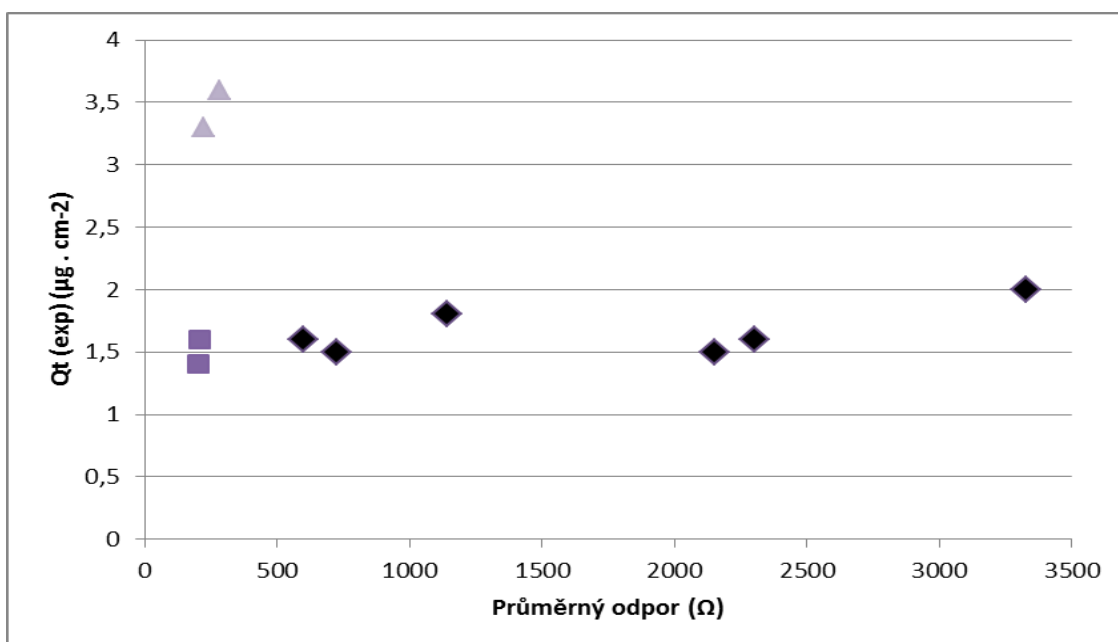
Číslo vzorku	Odpor 1 (Ω)	Odpor 2 (Ω)	Odpor 3 (Ω)	Průměr odporů (Ω)	$Q_{t_{24h}}$ (exp) ($\mu\text{g. cm}^{-2}$)
P1-1	286,2	299	299,8	295	---
P1-2	282	286	284	284	3,6
P1-3	219	222	219	220	3,3
P1-4	211	195	193	200	1,4
P1-5	274	269	267	270	---
P1-6	203	199	214	205	1,6

Tabulka 3.: Výsledky měření odporu membrán (ve fyziologickém roztoku) po sestavení cel - **Permeace P2** (14. 9. 2011) - množství prošlých nanočástic po 24 hodinách skrz membránu o velikosti 1cm^2 na elektrickém odporu.

Číslo vzorku	Odpor 1 (Ω)	Odpor 2 (Ω)	Odpor 3 (Ω)	Průměr odporů (Ω)	$Q_{t_{24h}}$ (exp) ($\mu\text{g. cm}^{-2}$)
P2-1	606	600	591	599	1,6
P2-2	2304	2304	2297	2302	1,6
P2-3	1146	1139	1138	1141	1,8
P2-4	2168	2148	2136	2151	1,5
P2-5	729	726	721	725	1,5
P2-6	3322	3330	3335	3329	2,0

Graf 2.: Závislost množství proniklých nanočástic na odporu membrán P1a P2.

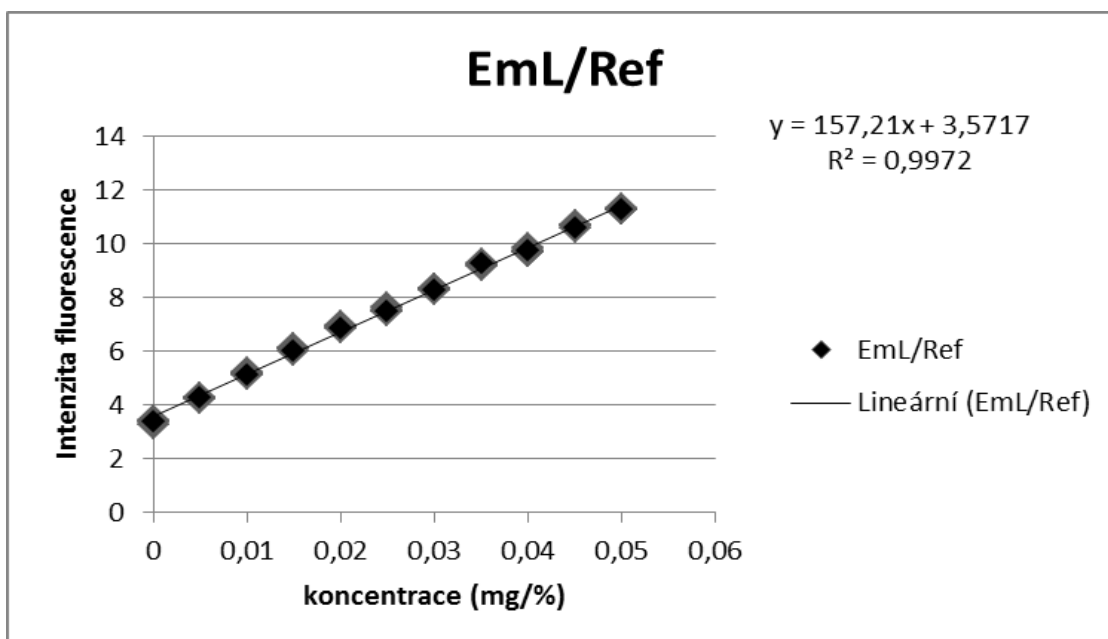
▲ vzorky P1-2, P1-3 neřaděné, ■ vzorky P1-4, P1-6 řaděné, ◆ vzorky P2-1, P2-2, P2-3, P2-4, P2-5, P2-6 neřaděné.



Výběr kalibrační přímky

Vybraná analytická metoda – spektrofluorimetrie - vyhovovala požadavkům na rychlé a citlivé stanovení obsahu prošlých nanočástic do akceptorového média.

Graf 3.: Kalibrační přímka naměřena 15. 9. 2011 – pro disperzi nanočástic.



Kalibrační přímka znázorněna na **grafu 7**, byla naměřena 15. 9. 2011. Byla vybrána ze 4 naměřených kalibračních přímek pro stanovení koncentrace nanočástic ve vzorcích z permeací P1 a P2, jelikož byla změřena za slunného počasí v odpoledních hodinách, stejně jako stanovované vzorky odebraných fází.

K tomuto rozhodnutí nás dovedl kolega Josef Janečka⁵³, který při vypracování své diplomové práce zjistil, že hodnota slepého vzorku nebyla stálá v čase a bylo třeba často proměřovat slepý vzorek, aby se potom mohl odečíst rozdíl mezi slepým a stanovovaným vzorkem.

Hodnoty získané spektrofotometricky v této diplomové práci jsou méně přesné, jelikož nám nebyly tyto skutečnosti v době měření známy a slepý vzorek byl vždy proměřen jen na začátku analýzy.

Příčina, proč je hodnota slepého vzorku nestálá, je stále předmětem úvah. Ing. Vladimír Kubíček, CSc z katedry biofyziky a fyzikální chemie FaF UK poskytl Josefovi Janečkovi⁵³ protokol, který dokládá, že čidlo spektrofotometru poskytuje stále výsledky, tudíž se spekuluje o vlivu teploty, či uvolňování bublinek ze vzorku.

Okna laboratoře s přístrojem spektrofotometru jsou orientována na jih, v odpoledních hodinách dochází k zahřívání místnosti vlivem slunečního záření. Může také docházet k ohřátí vzduchu v laboratoři samotným přístrojem, který je v provozu delší dobu. Z těchto důvodů by bylo vhodné vybavit laboratoř klimatizací.

Přesnost měření byla ovlivněna předem neočekávanými vlivy, které se nám nepodařilo podchytit.

DLS – Permeace P1 – vzorky odebraných akceptorových fází po 24 a 45 hodinách.

Po provedené permeaci P1 byla u vybraných vzorků (P1-1, P1-3 a P1-4) u odběrů akceptorových fází po 24 a 45 hodinách stanovena distribuce velikosti částic pomocí DLS. Vzorek P1-1 byl vybrán z důvodu zjištění protržení membrány, vzorky P1-3 a P1-4 jako zástupci vzorků s neřaděným, respektive řaděným donorem. Výsledky z těchto měření jsou uvedeny v **tabulkách 4, 5, 6, 7.**

Tabulka 4.: Permeace 1 – výsledky DLS po 24 h odebraného vzorku (nanočástice Chromeon 470 + pufr dle Söerensena o pH 7,4) akceptorové fáze – distribuce částic ve vzorcích – velikost jednotlivých píků.

Chromeon 470 Po 24 h	Měření	Z-Average (d. nm)	PdI	Pík 1 (d.nm)	Pík 2 (d.nm)	Pík 3 (d.nm)	Pík 1 (%)	Pík 2 (%)	Pík 3 (%)
P1-1	1	248,8	0,374	305,4	5207,0	0	97,3	2,7	0
	2	245,0	0,41	373,4	4659,0	0	96,6	3,4	0
	3	240,6	0,425	292,3	126,9,0	0	50,8	49,2	0
	4	247,5	0,396	361,7	4493,0	0	94,9	5,1	0
	5	236,4	0,389	353,1	5117,0	0	98,6	1,4	0
	6	238,2	0,394	314,5	5016,0	0	96,9	3,1	0
	Průměr SD	242,8 +-5,1	0,398 0,018	333,4	4103,2	0	89,2	10,8	0
P1-3	1	647,9	0,595	765,6	115,0	0	83,0	17,0	0
	2	577,9	0,646	700,0	145,3	0	80,2	19,8	0
	3	548,8	0,633	696,7	141,6	0	79,5	20,5	0
	Průměr SD	591,5 +-50,9	0,625 0,027	720,7	134,0	0	80,9	19,1	0
P1-4	1	560,9	0,845	857,7	113,4	5560,0	86,2	12,4	1,4
	2	544,7	0,841	765,7	78,3	5492,0	84,4	12,8	2,7
	3	580,7	0,647	799,2	158,9	38,1	80,6	12,2	7,2
	Průměr SD	562,1 +-18,0	0,777 0,113	807,5	116,9	3696,7	83,7	12,5	3,8

Tabulka 5.: Permeace 1 - výsledky DLS po 45 h odebraného vzorku (nanočástice Chromeon 470 + pufr dle Söerensena o pH 7,4) akceptorové fáze – distribuce částic ve vzorcích – velikost jednotlivých píků.

Vzorek po 45 h	Měření	Z-Average (d.nm)	PdI	Pík 1 (d.nm)	Pík 2 (d.nm)	Pík 3 (d.nm)	Pík 1 (%)	Pík 2 (%)	Pík 3 (%)
P1-1	1	358,9	0,694	526,3	150,0	5408,0	59,0	36,4	4,6
	2	421,5	0,611	353,3	104,5	0	80,0	20,0	0
	3	375,7	0,586	485,4	130,8	0	70,3	29,7	0
	Průměr	385,4	0,630	455,0	128,4	1802,7	69,8	28,7	1,5
	SD	+32,4	0,057						
P1-3	1	1693,0	0,998	374,9	0	0	100,0	0	0
	2	1147,0	0,653	855,1	117,7	0	88,0	12,0	0
	3	1101,0	0,739	678,8	69,9	0	91,4	8,6	0
	Průměr	1313,7	0,797	636,3	62,5	0	93,1	6,9	0
	SD	+329,3	0,180						
P1-4	1	910,7	0,779	1142,0	68,1	0	91,9	8,1	0
	2	802,2	0,947	1004,0	123,4	5255,0	77,7	11,3	11,0
	3	849,6	0,851	884,8	79,0	0	88,2	11,8	0
	Průměr	854,2	0,859	1010,3	90,2	1751,7	85,9	10,4	3,7
	SD	+54,4	0,084						

Při srovnání výsledků z měření po 24 hodinách vybraných vzorků s výsledky z DLS disperzí nanočástic v pufrch bylo na první pohled patrné vyšší hodnoty Z-Average u vybraných vzorků odebraných z akceptorové fáze při permeaci P1. Hodnota Z-Average vzorku P1-1 se nejvíce blíží hodnotám PD-Chromeonu 470, zřejmě díky většímu průniku nanočástic protrženou membránou. U vzorků P1-1, P1-4 byl navíc zjištěn výskyt píků velikostí částic větších než 4 000 nm a u vzorků P1-3 a P1-4 byly detekovány částice o velikostech v rozmezí cca 700 – 850 nm. Hodnoty Z-Average u vzorků odebraných po 45 hodinách jsou ve všech třech případech větší než u vzorků odebraných po 24 hodinách.

Na základě těchto výsledků byl formulován předpoklad, že jsou ve vzorcích přítomny kromě nanočástic PD-Chromeon 470 i částice větších velikostí, zřejmě nečistoty, nebo agregáty nanočástic. Je možné, že příslušné nanočástice v akceptorové fázi se shlukly po delší době stání vzorku v klidu, dosti pravděpodobná je i přítomnost

nečistot v podobě částí sublingvální membrány, jež se asi odlouply z membrány po delší době probíhající permeace. Z tohoto důvodu byly tyto vzorky podrobeny centrifugaci, aby případné nečistoty klesly na dno a nerušily stanovení. Výsledky z DLS centrifugovaných vzorků jsou uvedeny v **tabulce 6 a 7**.

U všech proměřených vzorků došlo po centrifugaci k poklesu hodnot Z-Average. U vzorku P1-1 bylo dosaženo hodnot Z-Average téměř shodných s PD-Chromeon 470. Nejméně se této hodnotě blížil vzorek P1-4, což by mohlo být způsobeno menším průnikem nanočástic z ředěného donoru.

Tabulka 6.: Permeace 1 - výsledky DLS po 24 h odebraného vzorku (nanočástice Chromeon 470 + pufr dle Söerensena o pH 7,4) akceptorové fáze – distribuce částic ve vzorcích – velikost jednotlivých píků – po centrifuze.

Centrifuga po 24 h	Měření	Z - Average (d. nm)	PdI	Pík 1 (d.nm)	Pík 2 (d.nm)	Pík 3 (d.nm)	Pík 1 (%)	Pík 2 (%)	Pík 3 (%)
P1-1	1	161,5	0,261	203,2	31,4	5223,0	97,3	1,6	1,1
	2	161,1	0,257	221,1	0	0	100,0	0	0
	3	167,4	0,268	205,2	42,6	5091,0	93,4	4,6	2,1
	Průměr	163,3	0,262	209,8	24,7	3438,0	96,9	2,1	1,1
	SD	+3,5	0,006						
P1-3	1	205,1	0,674	396,5	90,8	16,5	68,0	23,9	5,4
	2	243,3	0,641	515,4	127,8	12,6	58,7	35,6	3,6
	3	191,7	0,784	321,3	38,6	5196,0	86,8	8,5	4,7
	Průměr	213,4	0,700	411,1	85,7	1741,7	71,2	22,7	4,6
	SD	+26,8	0,075						
P1-4	1	365,5	0,461	542,2	81,8	18,9	68,0	25,6	6,4
	2	289,5	0,61	598,4	103,5	26,1	63,5	27,1	7,8
	3	230,7	0,601	634,0	116,3	17,7	54,7	35,9	6,7
	Průměr	295,2	0,557	591,5	100,6	20,9	62,1	29,5	7,0
	SD	+67,6	0,084						

Vzorky pro permeaci P1 po 24 hodinách - centrifuga a permeaci P2 po 45 hodinách - centrifuga byly připraveny postupem uvedeným v **oddíle 4. 8** a změřeny pomocí DLS. Výsledky z DLS jsou uvedeny v **tabulce 6** pro permeaci P1 a v **tabulce 7** pro permeaci P2.

Tabulka 7.: Permeace 1 - výsledky DLS po 45 h odebraného vzorku (nanočástice Chromeon 470 + pufr dle Söerensena o pH 7,4) akceptorové fáze – distribuce částic ve vzorcích – velikost jednotlivých píků – po centrifuze.

Centrifuga po 45 h	Měření	Z-Average (d. nm)	PdI	Pík 1 (d.nm)	Pík 2 (d. nm)	Pík 3 (d.nm)	Pík 1 (%)	Pík 2 (%)	Pík 3 (%)
P1-1	1	172,4	0,344	201,5	4732,0	0	94,4	5,6	0
	2	181,6	0,338	208,7	5185,0	0	96,7	3,3	0
	3	180,1	0,380	220,8	4609,0	0	93,9	6,1	0
	Průměr SD	178,0 +-4,9	0,354 0,023	210,3	4842,0	0	95,0	5,0	0
P1-3	1	335,8	0,516	428,3	80,3	13,6	62,5	32,1	5,5
	2	282,5	0,518	442,1	97,2	15,2	58,8	36,3	4,8
	3	+198,6	0,718	189,5	660,0	42,9	42,4	36,2	14,3
	Průměr SD	272,3 69,2	0,584 0,116	353,3	279,2	23,9	54,6	34,9	8,2
P1-4	1	493,9	0,563	548,7	47,7	0	78,4	21,6	0
	2	454,2	0,746	617,9	63,4	0	75,6	24,4	0
	3	422,9	0,606	593,6	92,2	30,8	67,2	21,0	10,0
	Průměr SD	457,0 +-35,6	0,638 0,096	586,7	67,8	10,3	73,7	22,3	3,3

Výsledky měření ze spektrofotometru

Výsledky byly vyhodnoceny na základě údajů $Q_{t(\text{exp})}$ získaných spektrofotometricky, kde $Q_{t(\text{exp})}$ představuje množství permeantu prošlého přes 1 cm^2 sublingvální membrány do akceptorové fáze.

Množství nanočástic prošlých do akceptorové fáze za 24 hodin v průběhu permeace P1 i permeace P2 bylo vyjádřeno procentuálně dle následujícího vzorce:

$$R = Q_{t(\text{exp})} / Q_d * 100.$$

$Q_d (\mu\text{g. cm}^{-2})$ - představuje množství nanočástic, které bylo nanášeno na sublingvální membrány (1 cm^2) v donoru v sériích měření P1 – P2. Množství nanočástic v donoru činilo $500 \mu\text{g}$ v neředěných vzorcích a $100 \mu\text{g}$ v ředěných vzorcích.

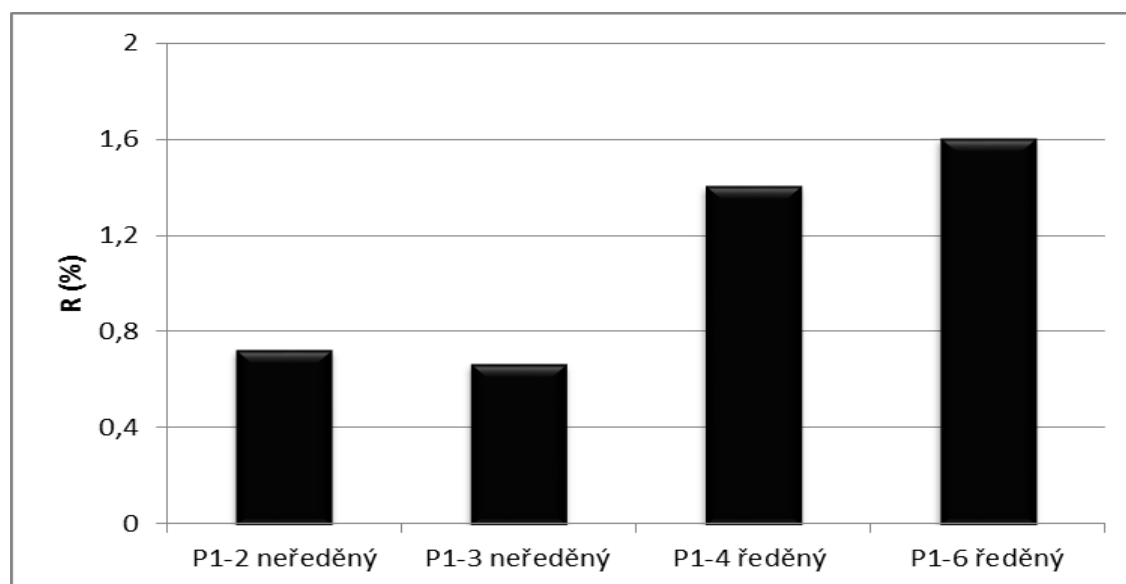
R (%) – procentuální vyjádření nanočástic prošlých do akceptorové fáze.

Permeace 1:

Tabulka 8.: Permeace 1 sublingvální membrána dlouhodobě zmrazená. P1-2, P1-3 neředěný donor (100 μl disperze nanočástic) a P1-4, P1-6 ředěný donor (100 μl nanočástic a 400 μl pufr pH 6,6 – ředění 1 : 4).

Permeace 1 24 hodin	Q_t (exp) ($\mu\text{g. cm}^{-2}$)	Q_d ($\mu\text{g. cm}^{-2}$)	R (%)
P1-2 neředěný	3,6	500	0,72
P1-3 neředěný	3,3	500	0,66
P1-4 ředěný	1,4	100	1,40
P1-6 ředěný	1,6	100	1,60

Graf 4.: Množství nanočástic přítomných v akceptorové fázi pro jednotlivé vzorky P1 po 24 hodinách.



Tabulka 8 uvádí množství permeantu prošlého přes 1 cm^2 sublingvální membrány do akceptorové fáze, jež je následně zobrazeno v **grafu 4**.

Porovnání permeace 1 – ředěné P1-4 a P1-6 x neředěné P1-2, P1-3:

Z **grafu 4** je patrné, že pronikaly nanočástice lépe z ředěných vzorků P1-4 a P1-6 než z neředěných P1-2 a P1-3. Mohlo to být způsobeno tím, že se nanočástice

ve zředěném vzorku tak rychle neshlukovaly v pórech membrány a neucpávaly je, na rozdíl od neředitelných vzorků.

Permeace 2:

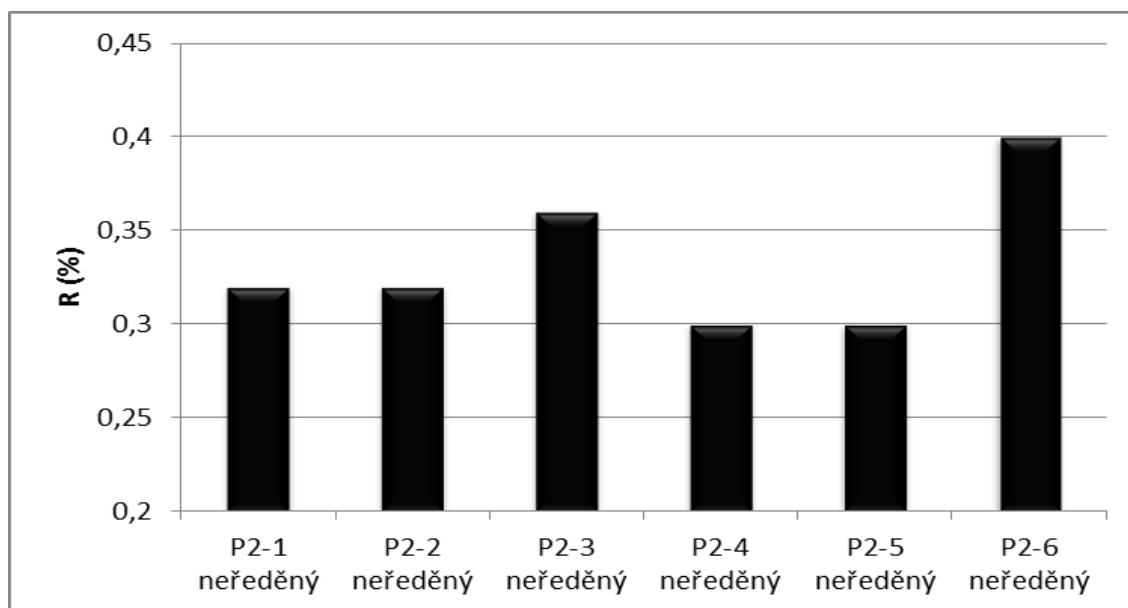
V permeačním pokusu P2 byly aplikovány na čerstvé prasečí sublingvální membrány ve fyziologickém roztoku pouze neředitelné vzorky. Toto rozhodnutí bylo učiněno na základě údajů získaných pomocí DLS z permeace P1, jelikož v době prováděného permeačního pokusu P2 nebyly ještě vyhodnoceny výsledky ze spektrofotometru. Výsledky z DLS nasvědčovaly tomu, že lépe pronikají nanočástice z neředitelných vzorků. Po vyhodnocení výsledků ze spektrofotometru z permeace P1 byl však zjištěn pravý opak.

Tabulka 9.: Permeace 2 čerstvá sublingvální membrána ve fyziologickém roztoku. Vzorek P2-1 - 6 neředitelné (100 µl disperze nanočástic).

Permeace 2	Qt (exp)	Qd	R
24 hodin	(µg. cm-2)	(g. cm-2)	(%)
P2-1 neředitelný	1,6	500	0,32
P2-2 neředitelný	1,6	500	0,32
P2-3 neředitelný	1,8	500	0,36
P2-4 neředitelný	1,5	500	0,30
P2-5 neředitelný	1,5	500	0,30
P2-6 neředitelný	2,0	500	0,40

Tabulka 9 uvádí množství permeantu prošlého přes 1 cm² sublingvální membrány do akceptorové fáze, což názorně zobrazuje **graf 5**.

Graf 5.: Množství nanočástic přítomných v akceptorové fázi pro jednotlivé vzorky P2 po 24 hodinách.



Porovnání permeace P1 neředěné vzorky P1-2 a P1-3 x permeace P2 neředěné vzorky P2-1 - 6:

Při permeaci 1 byla použita dlouhodobě zmrazená prasečí sublingvální membrána, zatímco při permeaci 2 čerstvá sublingvální membrána ponořená před permeací ve fyziologickém roztoku bez konzervačních látek. Přes dlouhodobě zmrazenou membránu pronikaly nanočástice o něco rychleji a více, než přes čerstvou membránu ponořenou ve fyziologickém roztoku, což mohlo být způsobeno zřejmě narušením struktury membrány zmrazením.

Pro první P1 i druhý P2 permeační pokus bylo sestaveno 6 cel. V **oddíle 9** pro permeaci P2 jsou uvedeny protokoly všech 6 vzorků P2-1 - 6, ale pro P1 jsou uvedeny pouze protokoly ke vzorkům P1-2, P1-3, P1-4 a P1-6. Vzorek P1-1 (neředěný) byl vyřazen ze zpracování výsledků, protože u něj bylo zjištěno protrhnutí prasečí sublingvální membrány. Vzorek číslo 5 není uveden v **oddíle 9**, jelikož byl zničen při vkládání krycích sklíček.

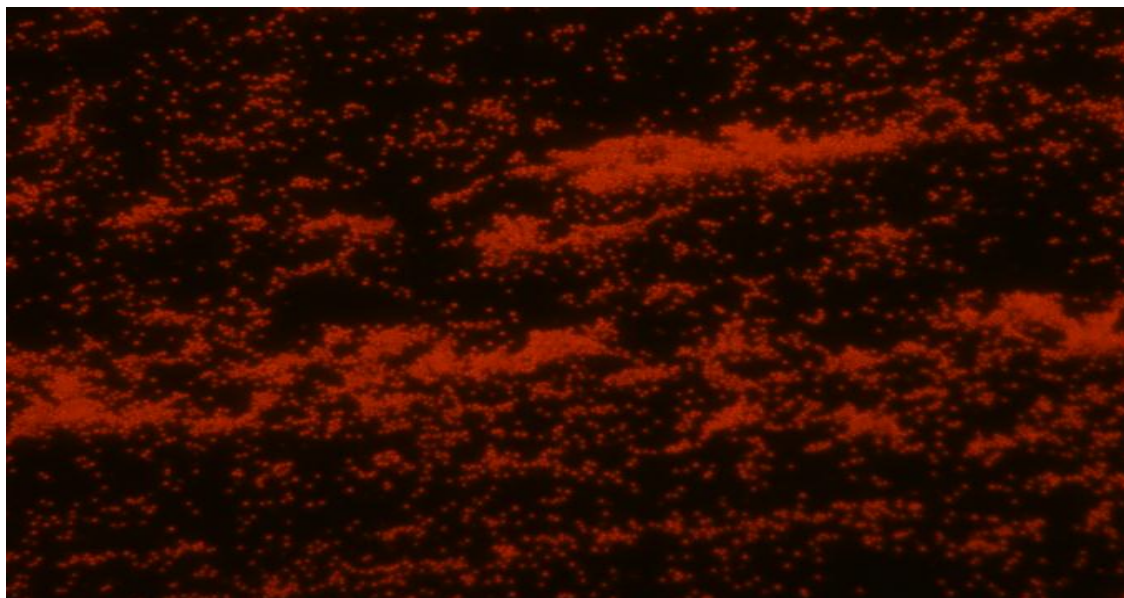
Pro lepší porovnání vzorků permeace P1 a P2 by bylo vhodné mít větší počet vzorků. Navrhla bych pro budoucí experimenty tohoto typu provést větší počet sérií měření s větším počtem vzorků pro jednotlivé série s ředěnými donory.

Fluorescenční mikroskopie - fotodokumentace

Preparáty – nanočástice PD-Chromeon 470 – koncentrovaný vzorek nanočástic

5. 9. 2011 byly připraveny preparáty z disperze nanočástic PD-Chromeon 470 a bylo ověřeno, že bude možné nanočástice pozorovat touto metodou a vyzkoušeno nastavení mikroskopu (filtr WIB, rozsah citlivosti snímáče ISO 200 až 1 600, doba expozice 7 ms, 50 ms nebo 100 ms). Toto nastavení bylo následně použito pro pozorování nanočástic v odebraných akceptorových fázích (9. 9. 2011, 15. 9. 2011) a na površích sublingválních prasečích membrán (9. 9. 2011, 15. 9. 2011).

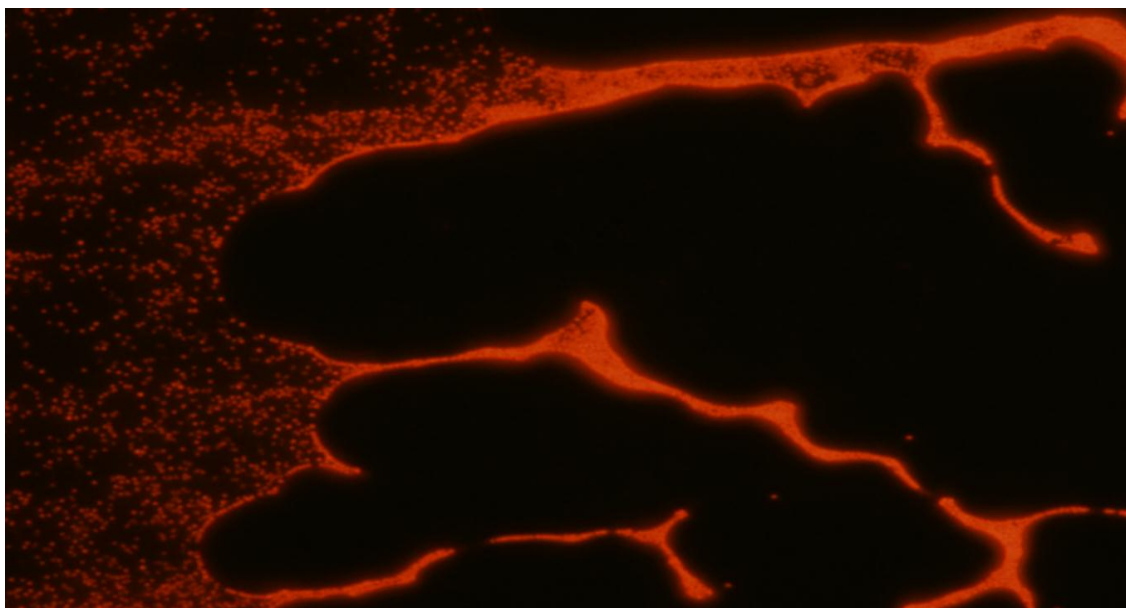
Obr. 1.: Nanočástice PD-Chromeon 470 – snímek z videa 1 v čase 00 : 04.



Popis: WIB, ISO 400, exp. 50 ms, objektiv 20x, zvětšení 200x.

V pozorovaném preparátu (**Obr. 1**) bylo možno pozorovat Brownův pohyb nanočástic PD-Chromeon 470.

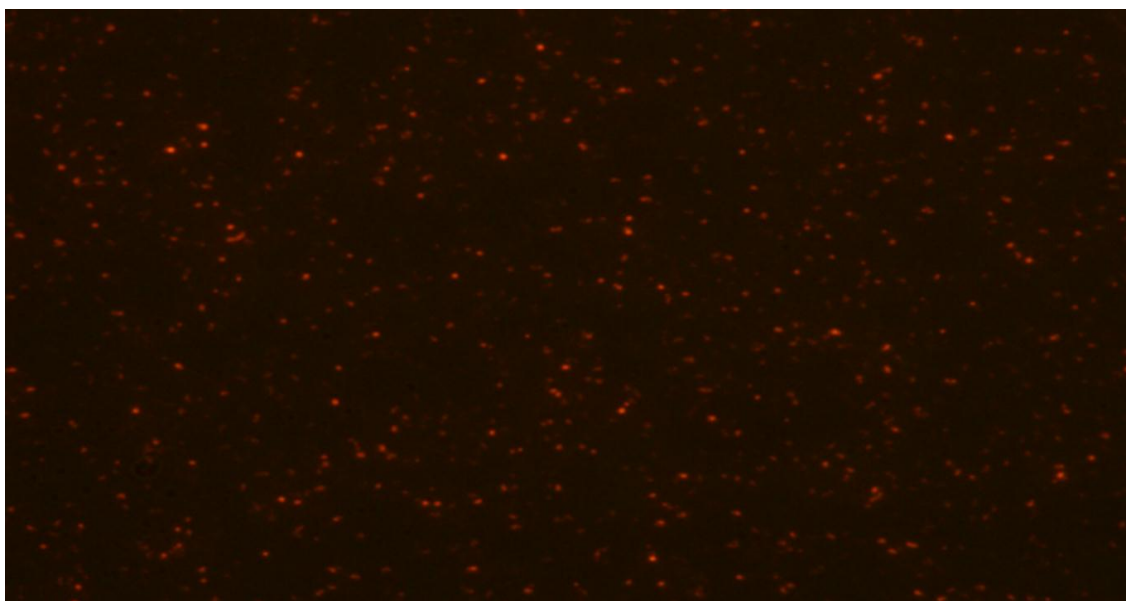
Obr. 2.: Nanočástice PD-Chromeon 470 – snímek z videa 3 v čase 00 : 13.



Popis: WIB, ISO 400, exp. 50 ms, objektiv 20x, zvětšení 200x.

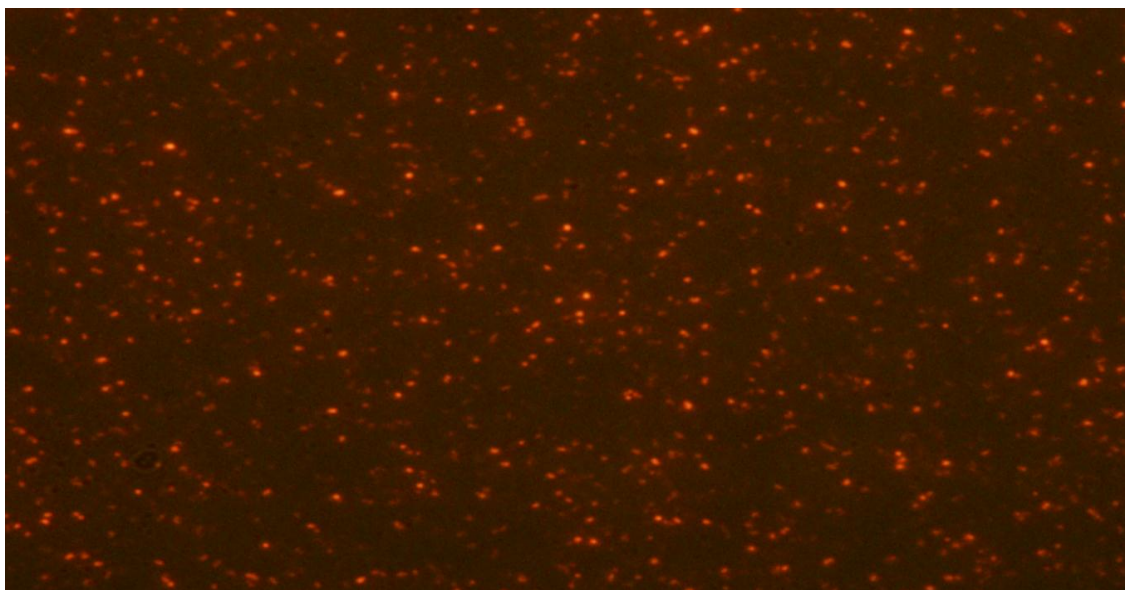
Na **Obr. 2** můžeme vidět shlukování nanočástic způsobené vysycháním preparátu, který nebyl ohraničen lakem na nehty. Na následujících obrázcích (**Obr. 3 – 4**) lze zaregistrovat větší tloušťku vrstvy disperze nanočástic (nanočástice ve více úrovních), způsobenou ohraničením preparátu lakem na nehty.

Obr. 3.: Nanočástice PD-Chromeon 470 – snímek z videa 12 v čase 00:04.



Popis: WIB, ISO 400, exp. 50 ms, objektiv 40x, zvětšení 400x.

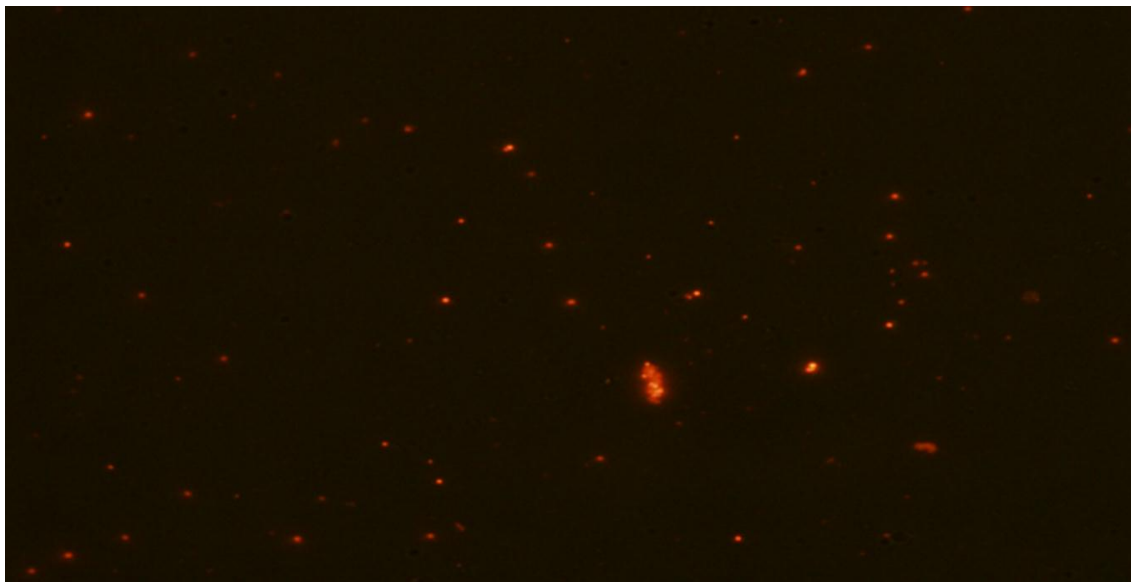
Obr. 4.: Nanočástice PD-Chromeon 470 – snímek z videa 13 v čase 00 : 04.



Popis: WIB, ISO 800, exp. 50 ms, objektiv 40x, zvětšení 400x.

**9. 9. 2011 – Permeace 1 – sledování odebraných akceptorových fází
a dlouhodobě zmrazených prasečích sublingválních membrán po 45 hodinách.**

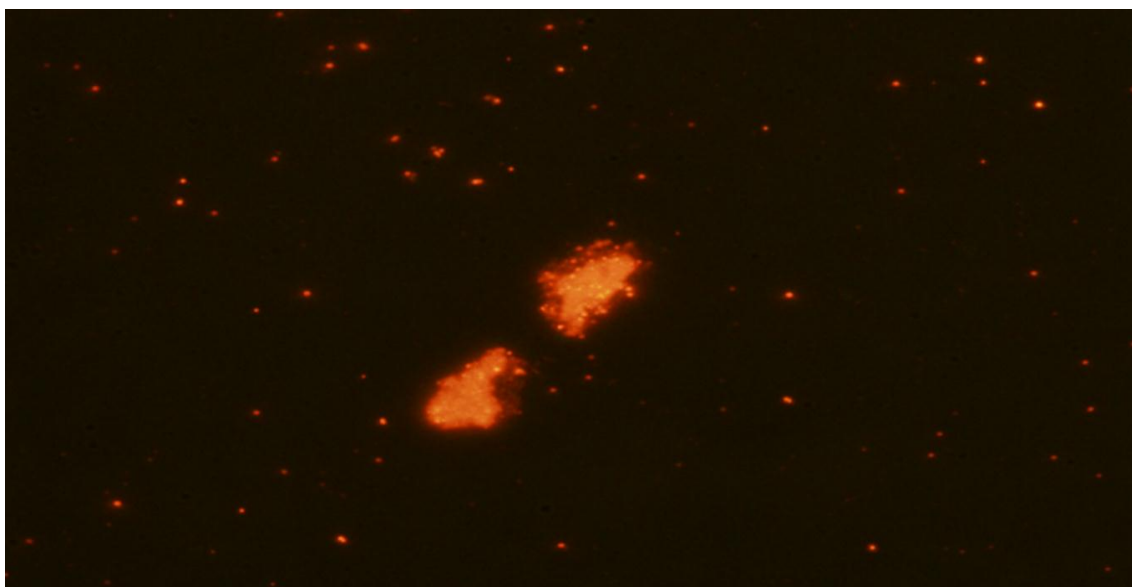
Obr. 5.: P1-1 – akceptorová fáze odebrána po 45 hodinách (1).



Popis: WIB, ISO 400, exp. 50 ms, objektiv 100x s imersním olejem, akceptorová fáze = pufr
pH 7,4 (Sørensen), po 24 hodinách již nedoplňována (bublina), zvětšení 1000 x.

Příprava vzorku: kapka překryta krycím sklíčkem, přimáčknuto, bez laku na nehty.

Obr. 6.: P1-1 – akceptorová fáze odebrána po 45 hodinách (3).

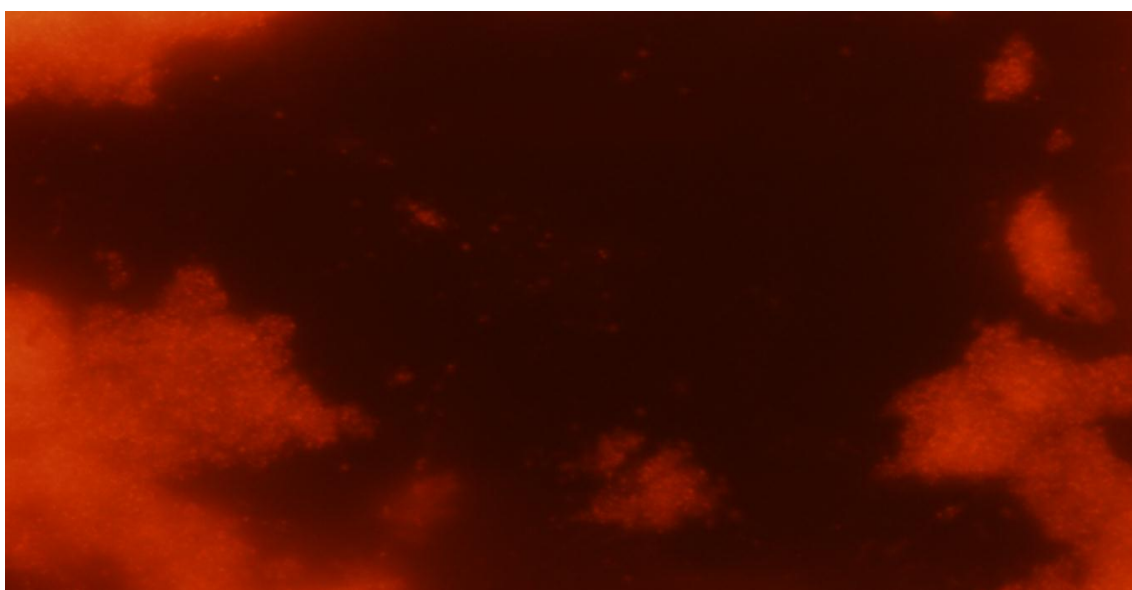


Popis: WIB, ISO 400, exp. 50 ms, objektiv 100x s imersním olejem, akceptorová fáze = pufr pH 7,4 (Sørensen), po 24 hodinách již nedoplňována (bublina), zvětšení 1000 x.

Příprava vzorku.: kapka překryta krycím sklíčkem, přimáčknuto, bez laku na nehty.

Relativně vysoký počet nanočástic v akceptorové fázi u vzorku P1- 1 z permeace 1, viditelný na **Obr. 5** a **Obr. 6** byl způsoben narušením membrány (viditelná trhлина). Kromě jednotlivých nanočástic lze pozorovat také jejich shluky, zřejmě přichycené na části odloupnuté membrány.

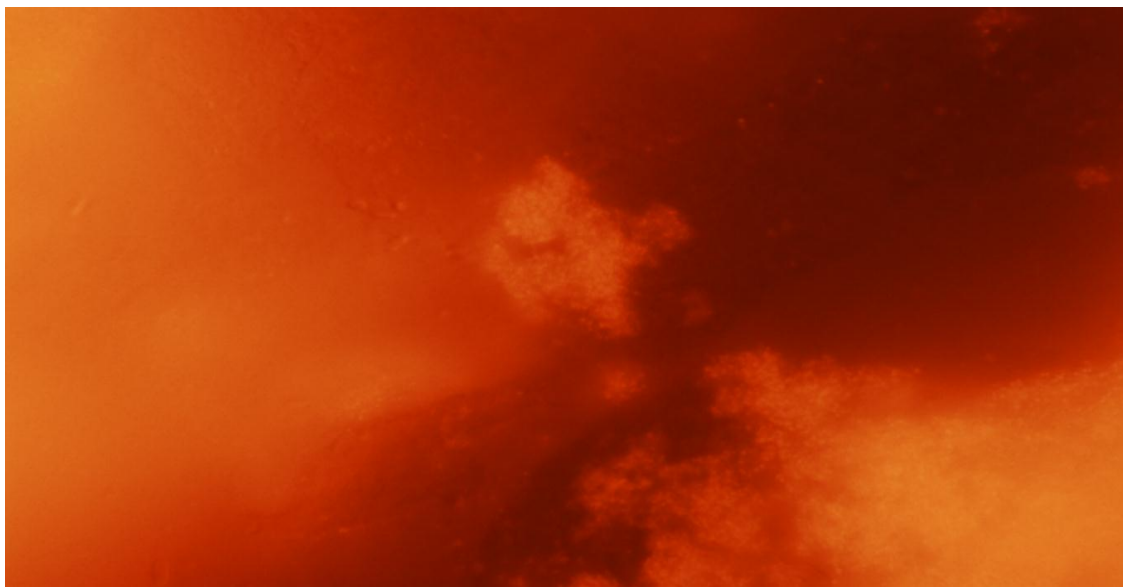
Obr. 7.: P1-1 – neopláchnutá membrána po 45 hodinách (2).



Popis: WIB, ISO 200, exp. 7 ms, objektiv 100 x, zvětšení 1000x.

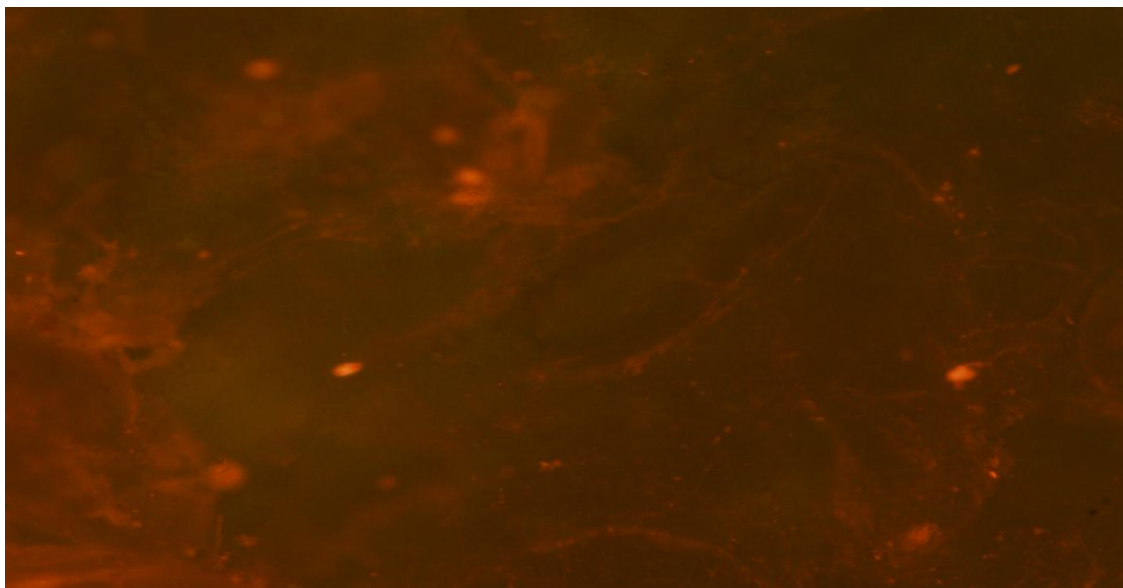
Na **Obr. 7** vidíme shluky nanočástic na povrchu membrány, po proostření bylo možno pozorovat výskyt nanočástic i v pórech membrány (**Obr. 8**). Tyto hlouběji zanořené nanočástice zůstaly na membráně i po jejím opláchnutí destilovanou vodou (**Obr. 9**).

Obr. 8.: P1 - 1 – neopláchnutá membrána po 45 hodinách (3).



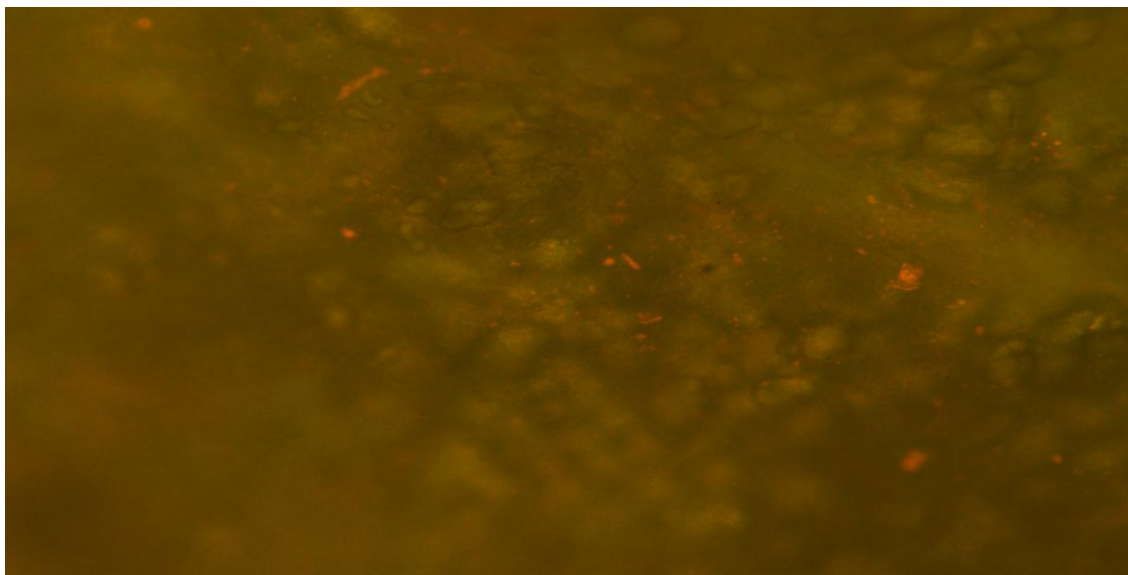
Popis: WIB, ISO 200, exp. 7 ms, objektiv 100 x, zvětšení 1000x.

Obr. 9.: P1-1 – membrána po oplachu po 45 hodinách (1).



Popis: WIB, ISO 200, exp. 7 ms, objektiv 10x, zvětšení 100x.

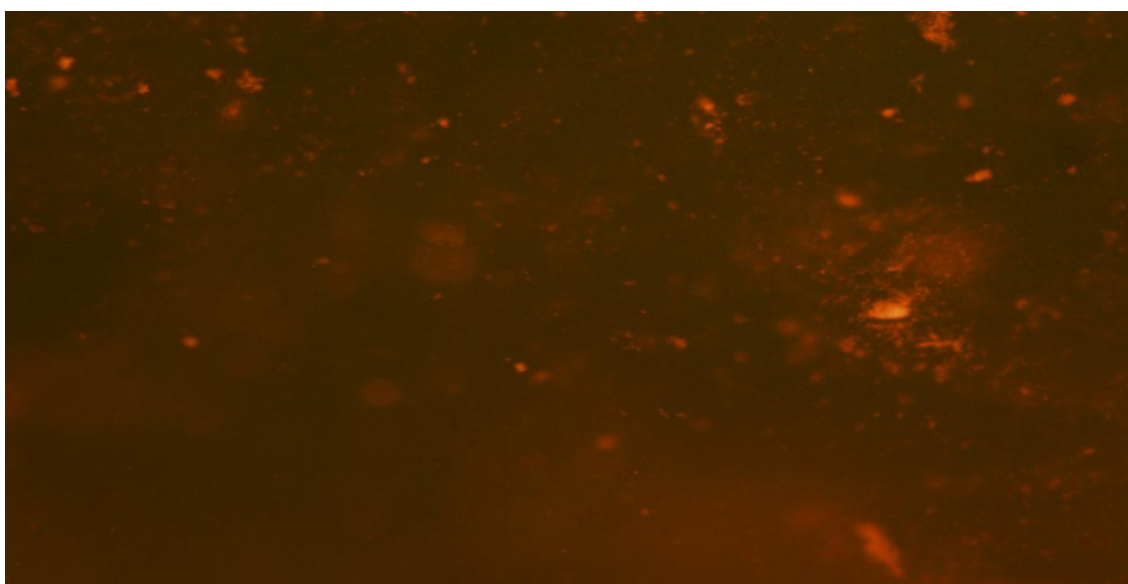
Obr. 10.: P1-1 – membrána po oplachu po 45 hodinách (3).



Popis: WIB, ISO 800, exp. 7 ms, objektiv 10x bez fluorescence, zvětšení 100x.

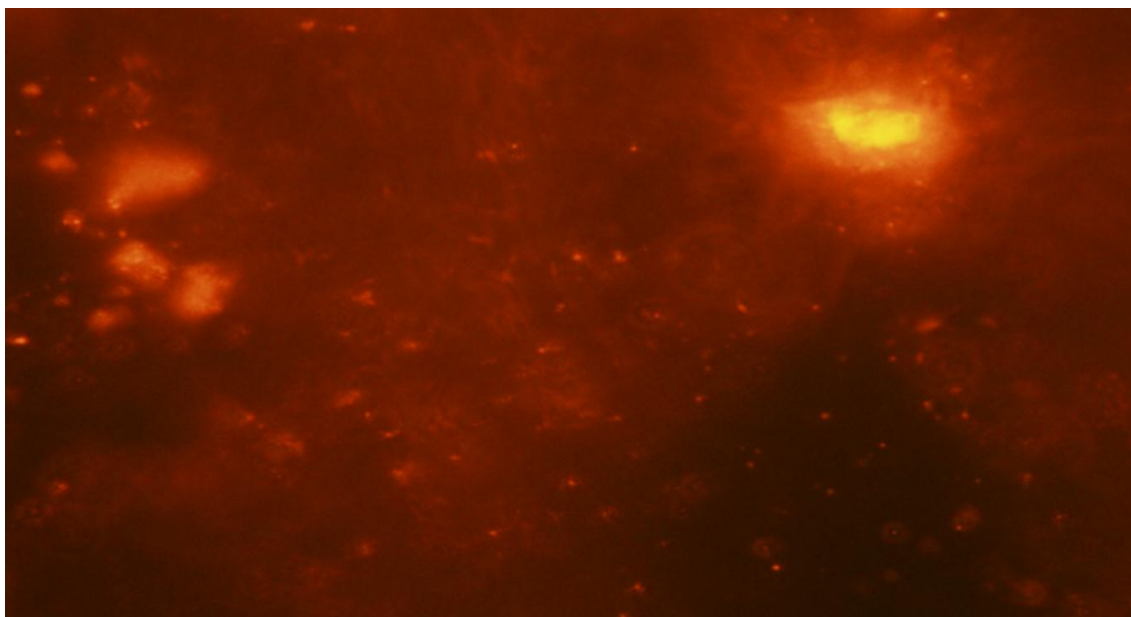
Na **Obr. 10** můžeme spatřit reliéf sublingvální membrány a v ní zachycené nanočástice Chromeon 470 – struktura membrány (její vrstvy) je patrná při proostřování preparátu, přičemž bylo možné pozorovat také nanočástice zanořené v různých vrstvách membrány. **Obr. 9 a 10** jsou ze stejného místa na pozorovaném preparátu, u druhého z nich byl odstíněn paprsek ze rtuťové výbojky, aby vynikla struktura povrchu membrány. **Obr. 11 a 12** jsou z téhož místa, liší se zvětšením a hloubkou proostření.

Obr. 11.: P1-1 - membrána po oplachu po 45 hodinách (1).



Popis: WIB, ISO 800, exp. 7 ms, objektiv 20x, zvětšení 200x.

Obr. 12.: P1-1 – membrána po oplachu po 45 hodinách (6).



Popis: WIB, ISO 1 600, exp. 7 ms, objektiv 100x, zvětšení 1000x.

Obr. 13.: P1-3 – akceptorová fáze odebrána po 45 hodinách (opakování 2).

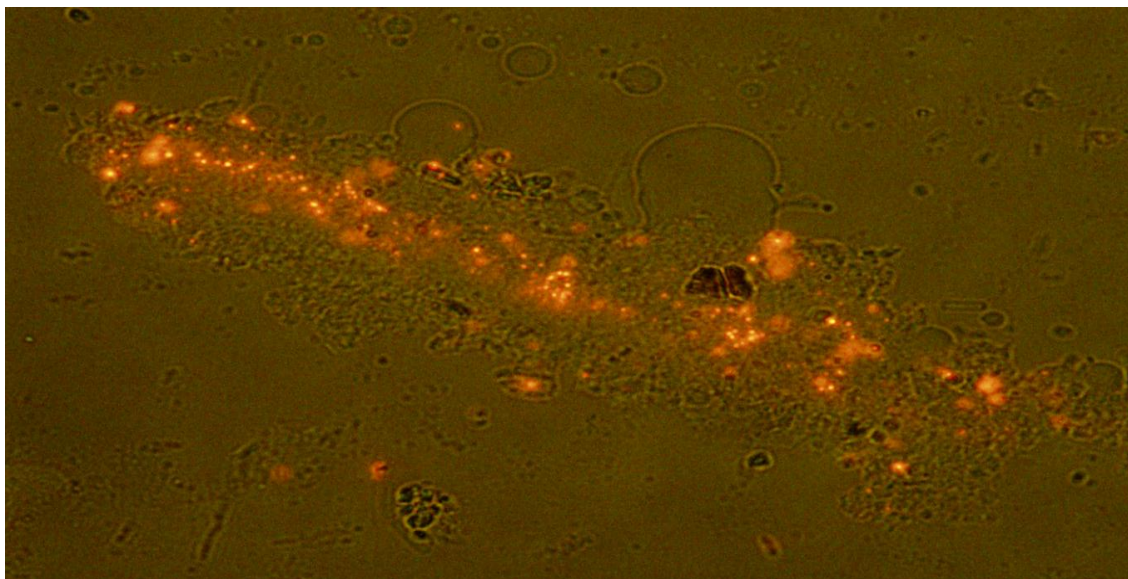


Popis: WIB, ISO 800, exp. 50 ms, objektiv 100 x s imersním olejem, akceptorová fáze = pufr pH 7,4 (Söerensen), donorová fáze = disperze nanočástic PD-Chromeon 470 neředěná, po 24hodinách již nedoplněna akceptorová fáze (bublina), zvětšení 1000x.

Příprava vzorku: kapka překryta krycím sklíčkem, přimáčknuto, poté olakováno.

Při porovnání **obrázku 13** (vzorek P1-3) s **obrázky 5, 6** (vzorek P1-1) můžeme vidět rozdíl mezi množstvím nanočástic proniklých do akceptorové fáze.

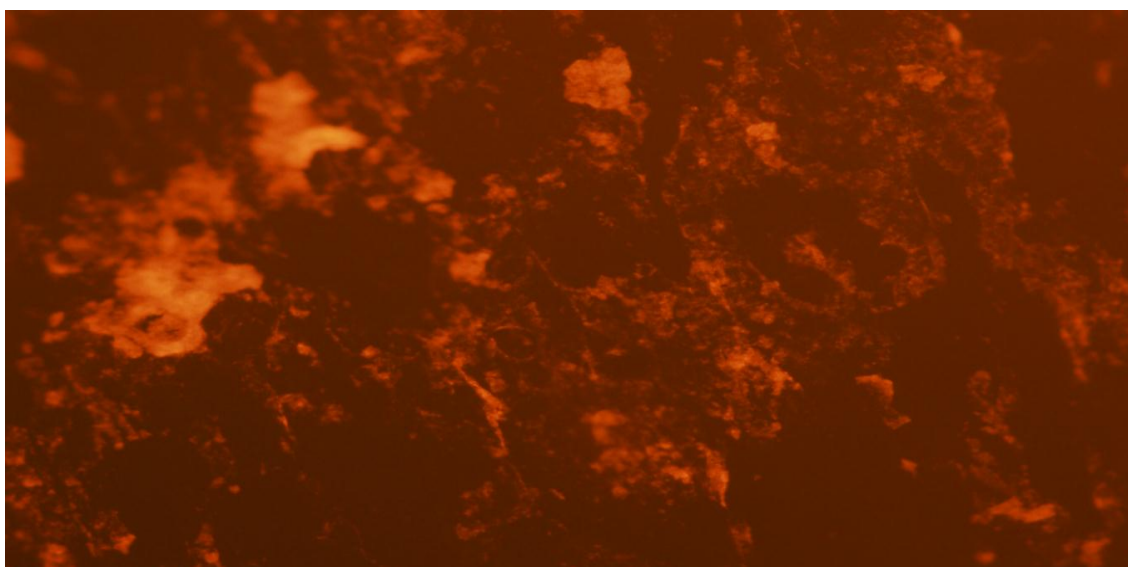
Obr. 14.: P1-4 – akceptorová fáze odebrána po 45 hodinách (1).



Popis: WIB, ISO 1 600, exp. 50 ms, objektiv 100 x s imersním olejem, akceptorová fáze = pufr pH 7,4 (Söerensen), donorová fáze = disperze nanočástic PD-Chromeon 470 ředěná 1 : 4 pufrém o pH 6,6, po 24 hodinách již akceptorová fáze nedoplněna (bublina), zvětšení 1000 x.
Příprava vzorek: kapka překryta krycím sklíčkem, přimáčknuto, poté olakováno.

Na **obr. 14** můžeme vidět shluky nanočástic v akceptorové fázi, jež se vytvořily pravděpodobně po delší době stání vzorku, či jsou to nanočástice zachycené na menší části odlouplé membrány.

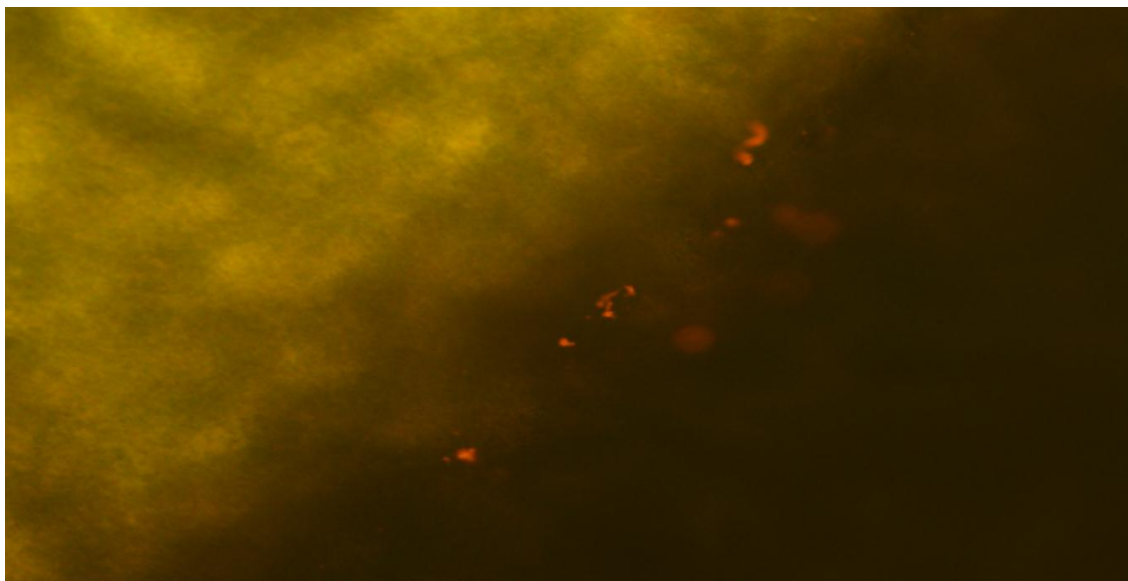
Obr. 15.: P1-4 – neopláchnutá membrána po 45 hodinách (1).



Popis: WIB, ISO 1 600, exp. 50 ms, objektiv 10x, zvětšení 100x.

Na **Obr. 15** vidíme shluky nanočástic na povrchu membrány, po proostření bylo možno pozorovat výskyt nanočástic i v pórech membrány.

Obr. 16.: P1-4 - membrána po oplachu po 45 hodinách (hrana 1 – okraj preparátu).

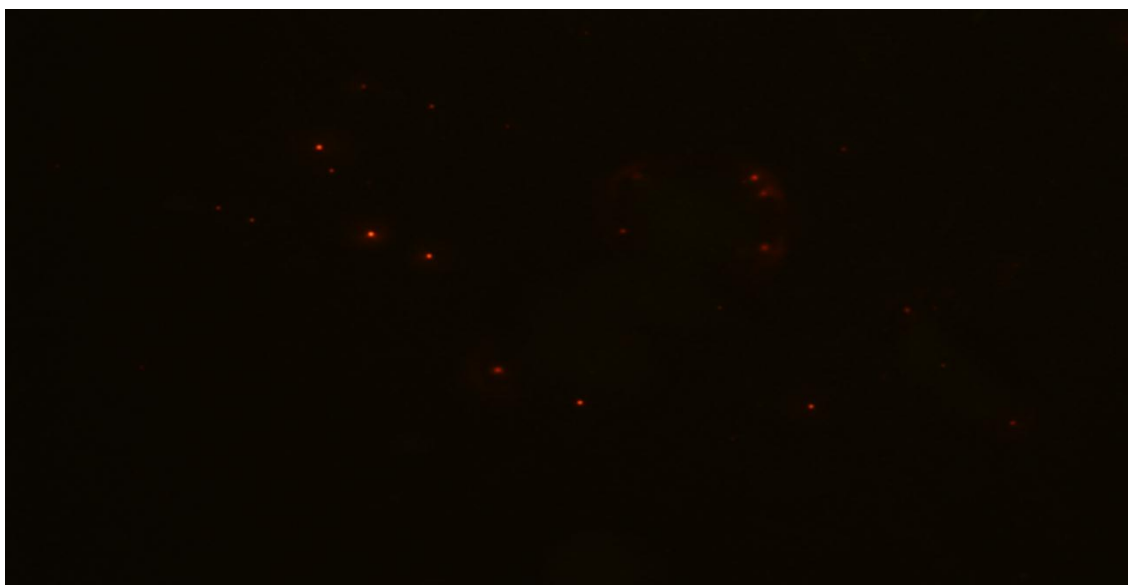


Popis: WIB, ISO 1 600, exp. 50 ms, objektiv 10x, zvětšení 100x.

Žlutá oblast vlevo na obrázku 16 je bez nanočástic – mimo aplikovanou plochu.

15. 9. 2011 Permeace 2 – disperze nanočástic aplikována na čerstvou sublingvální membránu ponořenou před permeací ve fyziologickém roztoku – pozorování vzorků akceptorových fází odebraných při permeaci P2 po 24 hodinách.

Obr. 17.: P2-1 – akceptorová fáze.



Popis: WIB, ISO 200, exp. 50 ms, objektiv 10 x, zvětšení 100x.

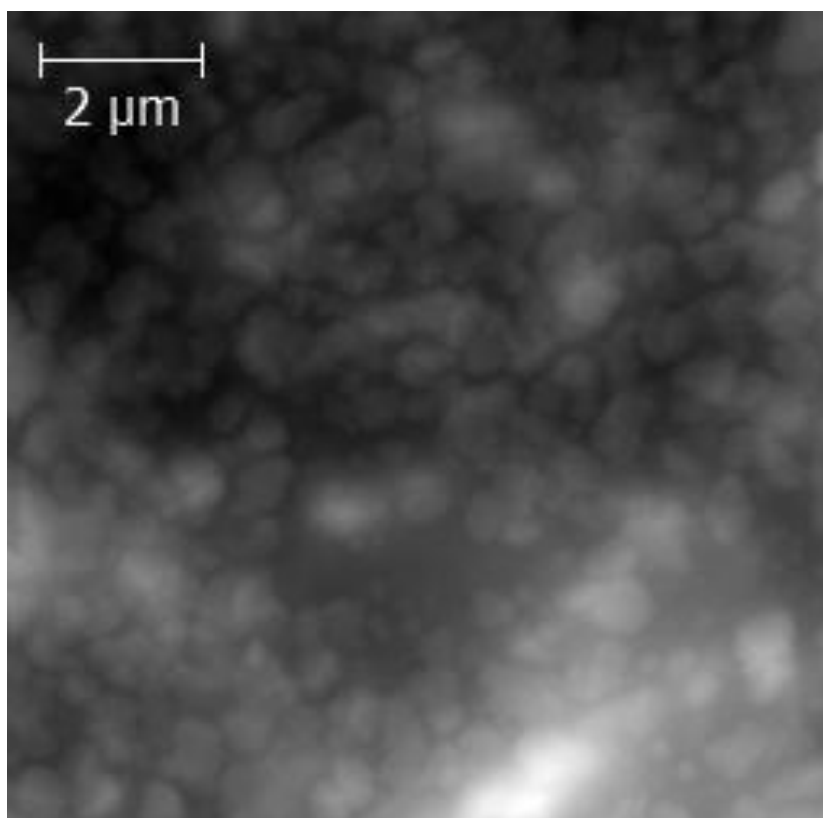
Obr. 18.: P2-1 – akceptorová fáze.



Popis: WIB, ISO 200, exp. 50 ms, objektiv 10 x, zvětšení 100x.

Na **Obr.17 a 18** můžeme pozorovat jednotlivé nanočástice a také shluky nanočástic PD-Chromeon 470 v odebrané akceptorové fázi vzorku P2-1.

Obr. 19.: Nanočástice značené fluorescenčním barvivem Chromeonem 470 byly zobrazeny pomocí mikroskopie atomárních sil (Chromeon - 33 – C – 10 μm – 1).



Obrázek 19 byl pořízen za pomoci mikroskopie atomární sil (AFM přístroj). AFM přístroj umožnil zviditelnit podobu nanočástic. Z obrázku je patrné, že nanočástice nejsou kulatého tvaru, jak jsme si představovali, ale mají podobu šupinek a jsou hodně polydisperzní.

Mikroskopie atomárních sil (AFM = atomic force microscopy) představuje mikroskopickou techniku, která se využívá k trojrozměrnému zobrazování pouze povrchů, nikoliv jejich objemových struktur. Poprvé ji realizovali v roce 1986 Binning, Quate a Gerber.⁵¹

6 ZÁVĚR

1. Pomocí DLS byly změřeny velikosti přítomných nanočástic v disperzi:

NČ + Aqua pro iniectione - 169,3 +- 0,723 nm

NČ + pufr o pH 7,4 - 169,7 +- 1,840 nm

NČ + pufr o pH 6,6 - 167,867 +- 1,365 nm

2. Stanovení pH disperze nanočástic: **pH** činilo **6,65**.
3. Membrány, které byly dlouhodobě zmrazeny, měly několikrát nižší transmembránový elektrický odpor než membrány čerstvé (ve fyziologickém roztoku).
4. Podíl nanočástic PD-Chromeon 470, které pronikly přes prasečí sublingvální membránu (1 cm^2) do akceptorové fáze po 24 hodinách z jejich celkového množství v donorovém vzorku.

Permeace P1 přes dlouhodobě zmrazenou membránu:

P1-2 neředěný – **0,72%**

P1-3 neředěný – **0,66%**

P1-4 ředěný (1:4) – **1,40%**

P1-6 ředěný (1:4) – **1,60%**

Permeace P2 přes čerstvou membránu ve fyziologickém roztoku:

P2-1 neředěný – **0,32%**

P2-2 neředěný – **0,32%**

P2-3 neředěný – **0,36%**

P2-4 neředěný – **0,30%**

P2-5 neředěný – **0,30%**

P2-6 neředěný – **0,40%**

5. Lépe pronikaly nanočástice přes dlouhodobě zmrazenou prasečí sublingvální membránu, než přes čerstvou membránu ve fyziologickém roztoku.
6. Přes dlouhodobě zmrazenou prasečí sublingvální membránu lépe pronikaly ředěné vzorky než neředěné.
7. Ze získaných údajů vyplynulo, že nanočástice PD-Chromeon 470 byly schopny průniku skrz prasečí sublingvální membránu, i když malého.
8. V diplomové práci Martiny Spurné⁵⁴ byly zjištěny následující podíly nanočástic PD-Chromeon 470 prošlých do akceptorové fáze po 24 hodinách z celkového množství v donorovém vzorku, které činilo **500 µg** pro neředěné vzorky:

Permeace P2 - přes sublingvální membránu v azidu sodném:

Vzorek 7 neředěný – **0,26%**

Vzorek 8 neředěný – **0,34%**

Vzorek 9 neředěný – **0,32%**

Vzorek 10 neředěný – **0,32%**

Vzorek 11 neředěný – **0,42%**

Vzorek 12 neředěný – **0,38%**

Permeace P2 - přes sublingvální membránu hodinu zmrazenou:

Vzorek 13 neředěný – **0,40%**

Vzorek 14 neředěný – **0,42%**

Vzorek 15 neředěný – **0,44%**

Vzorek 16 neředěný – **0,36%**

Vzorek 17 neředěný – **0,48%**

Vzorek 18 neředěný – **0,62%**

9. Dle procentuálního vyjádření podílu nanočástic PD-Chromeon 470 prošlých do akceptorové fáze po 24 hodinách z celkového množství v donorovém vzorku, které činilo 500 µg pro neředěné vzorky, či 100 µg pro ředěné vzorky, lze s opatrností, zapříčiněnou malým počtem vzorků, říci, že nejlépe pronikaly nanočástice PD-Chromeon 470 skrz dlouhodobě zmrazenou membránu, pak

přes hodinu zmrazenou membránu, membránu v azidu sodném a nejhůře přes čerstvou membránu ve fyziologickém roztoku. Mezi posledními třemi jmenovanými však nejsou velké rozdíly.

Pro budoucí experimenty tohoto typu bych navrhla provést větší počet sérií měření s větším počtem vzorků pro jednotlivé série měření.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

P1 – P2	první až druhá série měření
J [$\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$]	flux nanočástic
V₀ [ml]	celkové množství akceptorového média
V_{dop} [ml]	množství doplněného akceptorového média
t [h]	čas
C_{nk} [mg/100ml]	nekorigovaná koncentrace permeantu v akceptorové fázi
C_k [mg/100ml]	korigovaná koncentrace permeantu v akceptorové fázi
n	počet naměřených bodů
r	korelační koeficient
q	absolutní člen
Q_t [μg]	množství permeantu prošlého sublingvální membránou
Q_t [$\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$]	množství permeantu prošlého přes 1 cm ² sublingvální membrány
NČ	nanočástice
DLS	Dynamic light scattering – distribuce velikosti částic pomocí laserové difrakce
ISO	citlivost – fluorescenční mikroskop
WIB	filtr – fluorescenční mikroskop

8 ZDROJE

- 1 <http://nanotechnologie.vsb.cz/> (18. 11. 2011).
- 2 <http://ksicht.natur.cuni.cz/serialy/nanocastice/1> (16. 10. 2011).
- 3 Feynman, R. – přednáška *There's Plenty of Room at the Bottom*, Volume 23:5; Caltech Engineering and Science: California Institute of Technology, 1960, pp. 22-36. Citováno z - <http://nanomedicina.sweb.cz/> (15. 11. 2011).
- 4 <http://cs.wikipedia.org/wiki/Nanotechnologie> (8. 11. 2011).
- 5 Čihák, R.; Grim, M. *Anatomie 2*, 2nd-ed.; Grada: Praha, CZ, 2002; pp. 33 – 39.
- 6 Trojan, S.; Langmeier, M.; et al. *Lékařská fyziologie*, 4th-ed.; Grada: Praha, CZ, 2003; pp. 321 – 327.
- 7 Nachtigal, P. *Obecná histologie*, Hradec Králové, 2009. Praktická cvičení z Morfologie a fyziologie na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy na katedře biologických a lékařských věd.
- 8 Hronek, M.; Nachtigal, P.; Kudláčková, Z.; Zdanovcová, R. *Trávicí systém – histologická stavba*, Hradec Králové, 2009. Praktická cvičení z Morfologie a fyziologie na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy na katedře biologických a lékařských věd.
- 9 Čihák, R.; Grim, M.; Druga, R. *Anatomie 3*, 2nd-ed.; Grada: Praha, CZ, 2004; pp. 592 – 593.
- 10 Wanjek, Ch. The tongue map: tasteless myth debunked. *Nature*. US 2006.
- 11 Collings, V. B. Perception and psychophysics: human taste response as a function of locus of stimulation on the tongue and soft palate. 1974, 16, pp. 169 – 174.
- 12 Guyton, A. C. *Textbook of medical physiology*, 8th-ed., pp. 331, 340, 711. Citováno podle: <http://www.enotes.com/science/q-and-a/what-normal-ph-blood-urine-saliva-289069> (16. 4. 2012).
- 13 Merglová, V. Příčiny a prevence zubního kazu v časném dětství. *Lékařské listy*. 2008.
- 14 Kittnar, O.; et al. *Lékařská fyziologie*; Grada: Praha, CZ, 2011; pp. 316.
- 15 Marsh, P. D. Are dental disease examples of ecological catastrophes?. *Microbiology*. 2003, 149, pp. 279 – 294.

- 16 Chalabala, M.; Rabišková, M.; Chalupová, Z.; Komárek, P.; et al. Léky jako aplikační systémy. In *Technologie léků*, 2nd-ed.; Galén: Praha, CZ, 2006, pp. 199 - 315.
- 17 Lüllmann, H.; Mohr, K.; Wehling, M. *Farmakologie a toxikologie*, 2nd-ed.; Grada: Praha, CZ, 2004. Citováno podle:
http://www.wikiskripta.eu/index.php/Nanotechnologie_v_medic%C3%ADn%C4%9B/Nanotechnologie (6. 11. 2011).
- 18 Lincová, D.; Farghali, H.; et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*, 2nd-ed.; Galén: Praha, CZ, 2007; pp. 31 – 39.
- 19 Martínková, J.; et al. *Farmakologie: pro studenty zdravotnických oborů*; Grada: Praha, CZ, 2007; pp. 34 – 38.
- 20 Martínková, J.; Chládek, J.; Mičuda, S.; Cermanová, J.; Grim, J. *Obecná farmakologie: jako základ studia farmakologie experimentální a klinické*, Olga Čermáková: Hradec Králové, CZ, 2001; pp. 20 – 23.
- 21 http://farmakologie.webzdarma.cz/p4_aplikace_leciv_lekove_formy.ppt (13. 10. 2011).
- 22 <http://www.stallergenes.cz/odbornici-ve-zdravotnitvi/alergenova-imunoterapie/v-praxi/sublingvalni-tablety.html> (15. 11. 2011).
- 23 Villiers, de M. M.; et al. *Nanotechnology in drug delivery*. Springer: New York, USA, 2009, pp. 283 – 312, 581 – 596.
- 24 <http://www.news-medical.net/health/Nanoparticles-What-are-Nanoparticles.aspx> (22. 10. 2011).
- 25 Rosenberger, V.; et al. *Nanoparticles for drug delivery*. 10/977, 926, US 2005.
- 26 Makhlof, A.; Werle, M.; Tozuka, Y.; Takeuchi, H. A mucoadhesive nanoparticulate systém for the simultaneous delivery of macromolecules and permeation enhancers to the intestinal mucosa. *Journal of Controlled Release*. 2011, 149, pp. 81 – 88.
- 27 Ashady, R. Smart nano- and microparticles. Lodon, kentus Books 2006; pp. 417. Citováno podle: Rabišková, M. *Nanočástice pro léčivé formy*. Remedia 2007; 17: pp. 495 – 501.
- 28 Kubínek, R. *Vzdělávání v nanotechnologiích* [online]. 2011. (18. 11. 2011.)
- 29 Otčenášková, M. *Nanočástice mohou zabíjet rybí embrya* [online]. 2010. (18. 11. 2011)
- 30 Rabišková, M. *Nanočástice pro léčivé formy*. Remedia 2007; 17: pp. 495 – 501.

- 31 http://cs.wikipedia.org/wiki/Glatiramer_acet%C3%A1t (18. 4. 2012).
- 32 Balogh, L.; et al. Nanoletters 1 (2001) 18.
- 33 Keleher, J.; et al. World Journal of Microbiology & Biotechnology 18 (2002) 133.
- 34 Hollinger, M. A. Critical Reviews in Toxicology 26 (1996) 255.
- 35 Dossche, K. M.; et al. Journal of the Heart Valve Discussion 9 (2000) 123.
- 36 Bragg, P. D.; Rainnie, D. J. Canadian Journal of Microbiology 20 (1974) 883.
- 37 Lucas, L. J.; et al. Journal of Hospital Infection 40 (1998) 257.
- 38 Sanpui, P.; et al. The antibacterial properties of a novel chitosan-Ag-nanoparticle composite. *International Journal of Food Microbiology*. 2008, 124, pp. 142 – 146.
- 39 Wallheimer, B. Popular nanoparticles causes toxicity in fish, study shows. Purdue Newsroom. 2010.
- 40 http://www.chromeon.de/catalog/nanoparticles/pd_nano (6. 11. 2011).
- 41 <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm> (16. 10. 2011).
- 42 <http://web.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/fluorescenci.htm> (30. 9. 2011).
- 43 <http://www.chromspec.cz/produkty/detail.php?name=amincobowman> (5. 11. 2011).
- 44 Ministerstvo zdravotnictví ČR. Český lékopis 2009. Praha: Grada, 2009, pp. 94.
- 45 http://www.spachoptics.com/BX51_FL_p/olympus-bx51-fluorescence.htm (15. 10. 2011)
- 46 <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Fluorescence> (17. 9. 2011).
- 47 http://www.malvern.com/labeng/products/zetasizer/zetasizer_nano/zetasizer_nano_zs.htm (17. 9. 2011).
- 48 <http://www.malvern.com/zetasizer> (9. 10. 2011).
- 49 [www.Isinstruments.ch/.../dynamic light scattering_dls/](http://www.Isinstruments.ch/.../dynamic_light_scattering_dls/) (9. 10. 2011).
- 50 <http://www.vscht.cz/sch/www321/18S.html> (15. 9. 2011).
- 51 http://cs.wikipedia.org/wiki/Mikroskopie_atom%C3%A1rn%C3%ADch_sil (18. 4. 2012).
- 52 Eaton, P. Atomic Force Microscopy (AFM): Atomic Force Microscope [Online]. Version 25. Knol. 2010. Citováno podle: <http://knol.google.com/k/peter-eaton/atomic-force-microscopy-afm/25laaiqlcn2x8/3> (18. 4. 2012).

- 53** Janečka, J.: Sublingvální aplikace léčiv 6, Hradec Králové, 2011. Diplomová práce na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy na katedře farmaceutické technologie. Vedoucí práce: Doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.
- 54** Spurná, M.: Průnik nanočástic (Chromeon 470) sublingvální membránou 1, Hradec Králové, 2011. Diplomová práce na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy na katedře farmaceutické technologie. Vedoucí práce: Mgr. Pavel Berka.
- 55** Klemra, P.; Doležal, P.; Berka, P.; Svozil, M.: Šablona pro zpracování výsledků permeačních pokusů. Univerzita Karlova v Praze, farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2012.

9 PŘÍLOHA ⁵⁵

Protokol

P1-2

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

Vo : 18,2

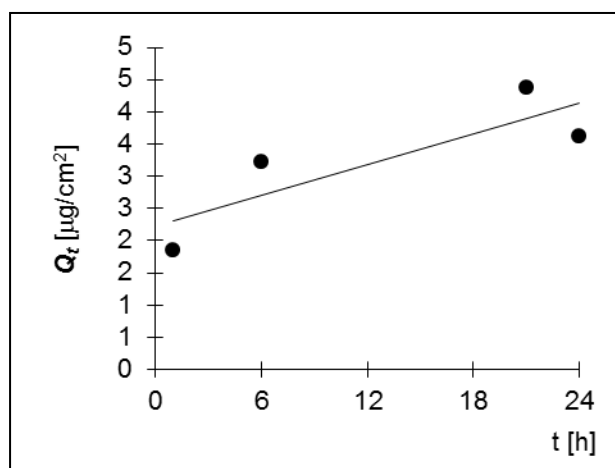
Jazyk

Měření: MP2011-1P

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	0,010	0,7	0,010	1,8	1,8
6	0,017	0,7	0,018	3,2	3,2
21	0,023	0,7	0,024	4,4	4,4
24	0,018	0,7	0,020	3,6	3,6

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
1	1,8	2,3
6	3,2	2,7
21	4,4	3,9
24	3,6	4,1

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 0,079536
Abs. člen	q = 2,227852
Korelační koef.	r = 0,844156



Protokol P1-3

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

V_o : 19

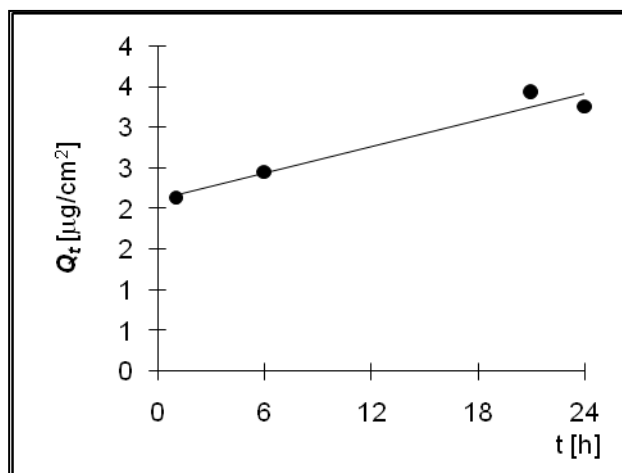
Jazyk

Měření: MP2011-1P

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	0,011	0,7	0,011	2,1	2,1
6	0,012	0,7	0,013	2,5	2,5
21	0,017	0,7	0,018	3,4	3,4
24	0,016	0,7	0,017	3,3	3,3

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	2,1	2,1
6	2,5	2,5
21	3,4	3,4
24	3,3	3,3

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 0,053922$
Abs. člen	$q = 2,117287$
Korelační koef.	$r = 0,975443$



Protokol P1-4

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1 \text{ cm}^2$

$V_o = 18,8$

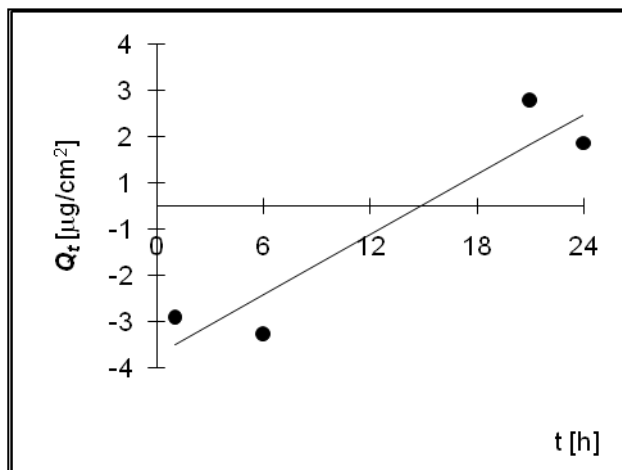
Jazyk

Měření: MP2011-1P

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	-0,013	0,7	-0,013	-2,4	-2,4
6	-0,014	0,7	-0,015	-2,8	-2,8
21	0,013	0,7	0,012	2,3	2,3
24	0,008	0,7	0,007	1,4	1,4

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	-2,4	-3,0
6	-2,8	-1,9
21	2,3	1,3
24	1,4	2,0

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 0,215776$
Abs. člen	$q = -3,20013$
Korelační koef.	$r = 0,939412$



Protokol P1-6

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

V_o : 17,9

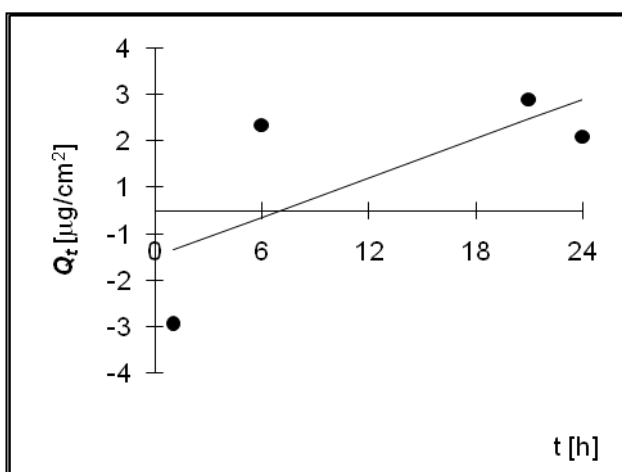
Jazyk

Měření: MP2011-1P

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	-0,014	0,7	-0,014	-2,4	-2,4
6	0,011	0,7	0,010	1,8	1,8
21	0,014	0,7	0,013	2,4	2,4
24	0,008	0,7	0,009	1,6	1,6

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	-2,4	-0,8
6	1,8	-0,1
21	2,4	2,0
24	1,6	2,4

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 0,140701$
Abs. člen	$q = -0,98399$
Korelační koef.	$r = 0,711788$



Protokol P2-1

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

V_o : 19

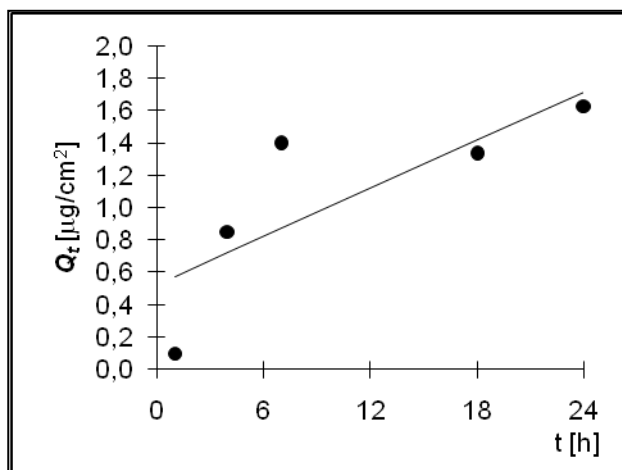
Jazyk

Měření: MP2011-2P

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	0,001	0,7	0,001	0,1	0,1
4	0,004	0,7	0,004	0,8	0,8
7	0,007	0,7	0,007	1,4	1,4
18	0,007	0,7	0,007	1,3	1,3
24	0,008	0,7	0,009	1,6	1,6

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	0,1	0,6
4	0,8	0,7
7	1,4	0,9
18	1,3	1,4
24	1,6	1,7

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 0,049669
Abs. člen	q = 0,523242
Korelační koef.	r = 0,799945



Protokol P2-2

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

Vo : 19

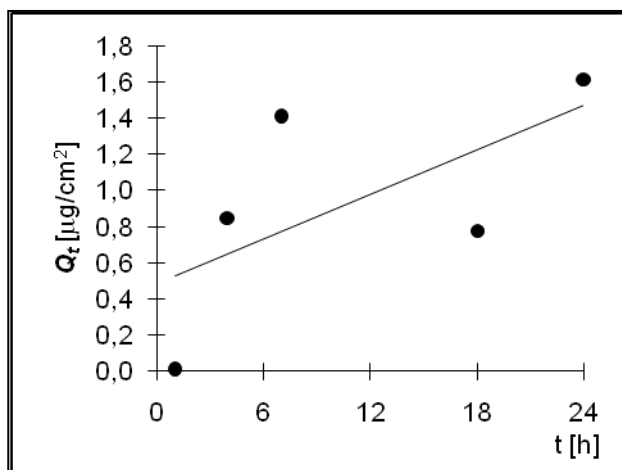
Jazyk

Měření: MP2011-2P

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	0,000	0,7	0,000	0,0	0,0
4	0,004	0,7	0,004	0,8	0,8
7	0,007	0,7	0,007	1,4	1,4
18	0,004	0,7	0,004	0,8	0,8
24	0,008	0,7	0,009	1,6	1,6

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	0,0	0,0
4	0,8	0,8
7	1,4	1,4
18	0,8	0,8
24	1,6	1,6

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 0,041114
Abs. člen	q = 0,487697
Korelační koef.	r = 0,641023



Protokol

P2-3

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

V_o : 16,6

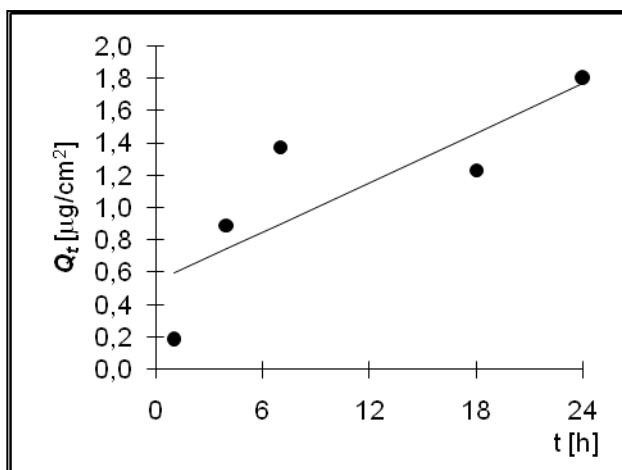
Jazyk

Měření: MP2011-2P

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	0,001	0,7	0,001	0,2	0,2
4	0,005	0,7	0,005	0,9	0,9
7	0,008	0,7	0,008	1,4	1,4
18	0,007	0,7	0,007	1,2	1,2
24	0,010	0,7	0,011	1,8	1,8

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	0,2	0,6
4	0,9	0,7
7	1,4	0,9
18	1,2	1,5
24	1,8	1,8

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,050949$
Abs. člen	$q = 0,543853$
Korelační koef.	$r = 0,823918$



Protokol P2-4

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

V_o : 17

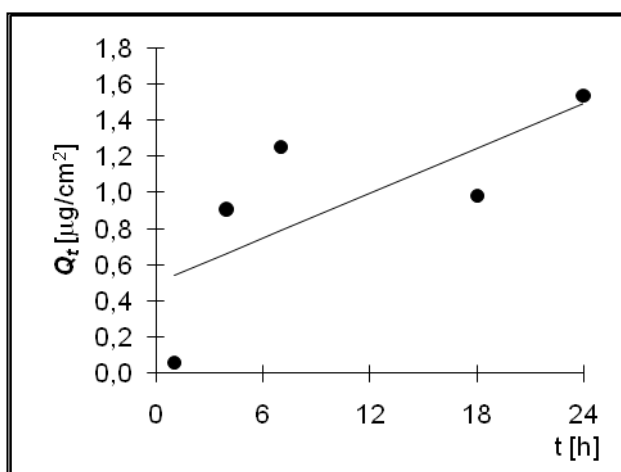
Jazyk

Měření: MP2011-2P

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	0,000	0,7	0,000	0,1	0,1
4	0,005	0,7	0,005	0,9	0,9
7	0,007	0,7	0,007	1,3	1,3
18	0,005	0,7	0,006	1,0	1,0
24	0,008	0,7	0,009	1,5	1,5

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	0,1	0,5
4	0,9	0,7
7	1,3	0,8
18	1,0	1,2
24	1,5	1,5

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,041484$
Abs. člen	$q = 0,499235$
Korelační koef.	$r = 0,731739$



Protokol P2-5

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

V_o : 17,4

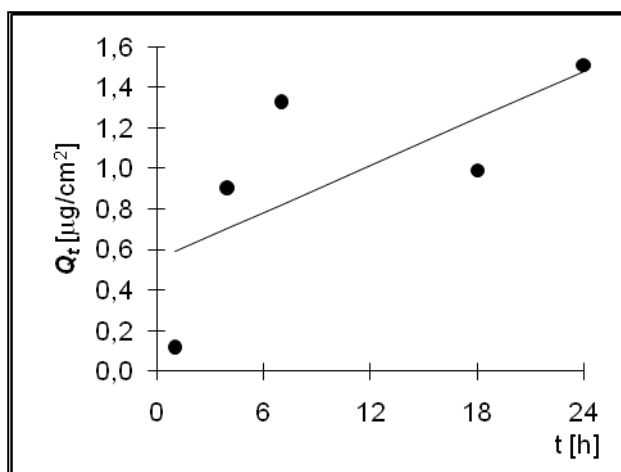
Jazyk

Měření: MP2011-2P

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	0,001	0,7	0,001	0,1	0,1
4	0,005	0,7	0,005	0,9	0,9
7	0,007	0,7	0,008	1,3	1,3
18	0,005	0,7	0,006	1,0	1,0
24	0,008	0,7	0,009	1,5	1,5

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	0,1	0,6
4	0,9	0,7
7	1,3	0,8
18	1,0	1,2
24	1,5	1,5

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,038781$
Abs. člen	$q = 0,54926$
Korelační koef.	$r = 0,705964$



Protokol P2-6

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

V_o : 16,9

Jazyk

Měření: MP2011-2P

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	0,002	0,7	0,002	0,4	0,4
4	0,008	0,7	0,008	1,3	1,3
7	0,010	0,7	0,011	1,8	1,8
18	0,009	0,7	0,010	1,7	1,7
24	0,011	0,7	0,012	2,0	2,0

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	0,4	1,0
4	1,3	1,1
7	1,8	1,3
18	1,7	1,8
24	2,0	2,1

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 0,050599
Abs. člen	q = 0,90785
Korelační koef.	r = 0,759481

